

**А. К. Дондуа**

# **БИОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ**

( в двух томах )

## **ТОМ I. ЭЛЕМЕНТЫ СРАВНИТЕЛЬНОЙ ЭМБРИОЛОГИИ**

Санкт-Петербург  
2004

© А. К. Дондуа

СОДЕРЖАНИЕ

**ВВЕДЕНИЕ. ОТ ОПИСАТЕЛЬНОЙ ЭМБРИОЛОГИИ  
К БИОЛОГИИ РАЗВИТИЯ** .....

15

16

**17 ЧАСТЬ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ОСНОВНЫХ ЭТАПОВ  
18 ИНДИВИДУАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ**

18.1 Глава 1.

Гаметогенез.....

18.2 Глава 2. Оплодотворение

.....

18.3 Глава 3.

Дробление.....

Глава 4. Гастрюляция. Зародышевые листки.....

Глава 5. Прямое и личиночное развитие. Метаморфоз.....

**ЧАСТЬ 2. ОСНОВНЫЕ ТИПЫ РАЗВИТИЯ ЖИВОТНЫХ**

18.3.1 РАЗДЕЛ 1. НИЗШИЕ МНОГОКЛЕТОЧНЫЕ

Глава 6. Губки (Porifera).....

Глава 7. Двухслойные (Diploblastica).....

7.1. Стрекающие (Cnidaria).....

7.2. Гребневики (Ctenophora).....

РАЗДЕЛ 2. БИЛАТЕРАЛЬНЫЕ METAZOA

Глава 8. Lophotrochozoa .....

8.1. Спиральные (Spiralia).....

8.2. Щупальцевые (Lophophorata).....

Глава 9. Ecdysozoa .....

9.1. Круглые черви (Nematoda).....

9.2. Членистоногие (Arthropoda).....

9.2.1. Хелицерные (Chelicerata).....

9.2.2. Жабродышащие. Ракообразные .....

9.2.3. Многоножки

9.2.4. Насекомые (Insecta).....

Глава 10. Deuterostomia. Иглокожие. (Echinodermata).....	
Глава 11. Deuterostomia. Низшие хордовые. ....	
11.1. Оболочники (Tunicata). ....	
11.2. Головохордовые или бесчерепные (Acrania). ....	
Глава 12. Deuterostomia. Низшие позвоночные (Anamnia) ....	
12.1. Круглоротые. Минога. ....	
12.2. Амфибии (Amphibia).....	
12.3. Костистые рыбы. (Teleostei) ....	
Глава 13. Deuterostomia. Высшие позвоночные (Amniota) ....	
13.1. Sauropsida: рептилии и птицы ....	
13.2. Млекопитающие (Mammalia).....	
Глава 14. Онтогенез и эволюция.....	
Литература.....	
Предметный указатель.....	

## **ВВЕДЕНИЕ. ОТ ОПИСАТЕЛЬНОЙ ЭМБРИОЛОГИИ К БИОЛОГИИ РАЗВИТИЯ.**

Эмбриология, если формально следовать за термином, это --- наука о зародышах и зародышевом развитии. Действительно, греческое слово *эмбрион* (εμβριων) означает нечто растущее внутри оболочек, чрева и т.п. Однако эмбриология никогда не ограничивала себя столь узкими рамками. Реальное ее содержание состоит в изучении морфогенетических процессов на разных этапах индивидуального развития независимо от того, является ли это развитие следствием полового или бесполого размножения. Существенным разделом эмбриологических исследований всегда были морфогенетические процессы, происходящие и в ходе регенерации органов животных. Можно сказать, что основная задача современной эмбриологии состоит в изучении механизмов морфогенеза и их эволюции.

Специфика биологии развития состоит в том, что она рассматривает формообразовательные процессы в четырех измерениях: не только в пространстве, но и во времени. Важно при этом иметь в виду, что эмбриология имеет дело, главным образом, с ациклическими, неповторяющимися явлениями, так что процесс индивидуального развития представлен последовательным рядом этапов или стадий. Каждая стадия отличается своими специфическими функциями, и создает предпосылки для следующих этапов развития. Половому размножению животных предшествует период, в течение которого происходит *гаметогенез*, т.е. образование специализированных мужских и женских половых клеток. Роль женских половых клеток в предопределении свойств зародыша столь велика, что формирование женских гамет иногда называют *проэмбриональным развитием*. Эмбриональное развитие начинается после *оплодотворения*, которое создает предпосылки для образования многоклеточного зародыша. Возникающая в ходе *дробления* яйца многоклеточность создает предпосылки для дифференциации клеток. По завершении дробления клетки зародыша приобретают способность к двигательной активности. Благодаря этому становятся возможными разнообразные морфогенетические движения клеток и клеточных пластов. Морфогенетические процессы, в ходе которых формируются зачатки зародыша,

скоординированы в пространстве и во времени с процессами дифференциации и пролиферации клеток.

Индивидуальное развитие возможно лишь благодаря глубокой координации элементарных процессов, лежащих в основе онтогенеза, а именно, благодаря интеграции клеточного размножения, клеточной дифференциации и морфогенетических движений. Перед современной эмбриологией стоит колоссальной сложности задача --- не только изучить механизмы, лежащие в основе элементарных составляющих процесса индивидуального развития, но и выяснить закономерности их соподчинения в условиях динамической смены частных программ развития, действующих на разных этапах онтогенеза.

Отличительной особенностью современной эмбриологии является ее интегративный характер. Понимание закономерностей развития организма может быть достигнуто только при синтезе морфологических, молекулярно-биологических, генетических и эволюционных подходов. Интегративный характер современной эмбриологии подчеркивается ее новым наименованием. Эмбриология наших дней это не просто наука о развитии, это --- *биология развития*. Новое название подчеркивает вместе с тем, что в круг интересов этой новой отрасли биологии входят все явления, где происходит развитие формы и функции. Если эмбриология родилась, как особая дисциплина, в результате ветвления единого ствола зоологической науки, то биология развития, как наука о движущих силах развития, возникла благодаря интеграции подходов всех отраслей биологии, изучающих живую материю на разных уровнях ее организации.

Современная биология развития ведет интенсивные исследования молекулярных, биохимических и генетических механизмов различных формообразовательных процессов, активно изучает особенности субклеточной и клеточной организации зародышей. Естественно, что не утратили своего значения гистологические и анатомические исследования. Безусловную актуальность сохраняют исследования эволюции онтогенеза, и, прежде всего, исследования эволюции механизмов онтогенеза. Это новое направление --- эволюционная биология развития --- в англоязычной литературе получило сокращенное наименование “Evo-Devo”.

Нетрудно заметить, что онтогенез имеет выраженное внутреннее противоречие. Действительно, он отличается (во всяком случае, на ранних этапах) высокой степенью динамизма, постоянной сменой одних состояний другими. Однако при рассмотрении развития животных в ряду поколений обнаруживается высокая консервативность организации индивидуального развития особи данного вида, благодаря которой и возможна преемственность поколений. Отсюда следует, что должен существовать некий механизм, который обеспечивает в ряду поколений передачу способности к развитию идентично организованных во времени и пространстве структур.

Любая теория, претендующая на объяснение индивидуального развития, должна найти решение этой проблемы. История эмбриологии на протяжении последних трех столетий в теоретическом плане, по существу, является историей соотношения двух основных идей, претендовавших на объяснение природы консерватизма и развития в эмбриогенезе.

**Преформизм и эпигенез.** В XVII --- XVIII вв. сложилось убеждение, что в половых клетках животных уже имеются предобразованные (*преформированные*) структуры. Сущность формирования зародыша состоит, согласно этим взглядам, в увеличении размеров и в уплотнении изначально имеющихся структур. Преформисты полагали, что органы будущего индивидуума предначертаны (теория пределинеации) в миниатюре либо в яйце, либо в сперматозоиде. Сторонники первой точки зрения (*овисты*) обосновывали свои взгляды известными в то время фактами *партеногенеза*, девственного развития без осеменения (Бонне, 1740). Сторонники второй (*анималькулисты*) находили подтверждение своим взглядам в структуре спермия. Наблюдения над биологией размножения вольвокса, тлей и других организмов, с одной стороны, и логика преформизма, с другой, явились основанием *теории вложений*, согласно которой в половых клетках прародительской формы должны быть структурно оформлены органы всех последующих генераций. Теория вложений была прекрасным, хотя и абсурдным, с современной точки зрения, объяснением единства развития и наследуемости.

Процветание преформистских идей было приостановлено накоплением фактов, которые не укладывались в рамки этой теории. Главными источниками этих противоречащих преформизму наблюдений были данные тератологии, генетики и эмбриологии. Так, основатель экспериментальной тератологии Сент-Иллер и его последователи убедились в том, что при определенных воздействиях на развивающийся организм структура возникающих органов существенно отличается от «предначертанных». Возникающие при скрещивании промежуточные формы, несущие и материнские, и отцовские признаки, будь то метисы или гибридные формы табака (Кельрейтер, 1766), также не могли найти объяснения в рамках наивного преформизма.

Наконец, данные эмбриологии, свидетельствующие о разной скорости развития различных систем органов, или об изменениях положения органа в ходе индивидуального развития, делали все более привлекательной идею *эпигенеза*, согласно которой структуры не преобразованы, а возникают заново.

Надо заметить, что первая формулировка эпигенетической теории развития принадлежит великому Аристотелю, жившему в IV веке до нашей эры. Аристотель, который по праву может считаться первым эмбриологом и которому принадлежит первое научное описание развития куриного зародыша, полагал, что форму развивающегося зародыша создает особая сила --- *энтелехия*, присущая мужскому семени, тогда как материалом, подвергающимся действию энтелехии, служит кровь (у человека --- менструальная кровь). Для всех эпигенетических теорий (термин «эпигенез» был предложен Вильямом Гарвеем в XVII столетии) вопрос о движущей силе эмбрионального развития представлял наибольший интерес и наибольшую загадку.

В основополагающем труде, посвященном развитию куриного эмбриона, Каспар Фридрих Вольф (рис. 0-1), впоследствии член Петербургской академии, в 1759 году на основании тщательного описания анатомических изменений зародыша строго доказал, что кишечная и нервная трубка возникают путем сворачивания или выпячивания клеточных пластов с последующим обособлением трубок. Эти прямые наблюдения не оставляли тени сомнения в

иллюзорности идей преформизма: в индивидуальном развитии организма происходит реальное формообразование. Что касается механизма этого формообразования, то подобно Аристотелю, Вольф зашифровывает его термином *vis essentialis* --- «существенная сила».

Аналогичная идея развивалась современником Вольфа Блюменбахом, который объяснял морфогенетические процессы, наблюдаемые при регенерации гидры, за счет действия «формообразовательного импульса» --- *Bildungstrieb* или *nisus formativus*. Согласно Блюменбаху, эпигенез направляется преформированной в половых клетках «силой развития», которая может рассматриваться как некая инструкция, предопределяющая морфогенез зародыша. Если это так, то ключ к пониманию явления развития состоит в раскрытии природы этих «инструкций». Нетрудно заметить, что такого рода идеи, высказанные во второй половине XVIII столетия, являются своего рода логическим предвосхищением современных представлений о механизмах индивидуального развития.

История эмбриологии в известном смысле это история поисков объяснения сочетания консервативного начала индивидуального развития, которое проявляется в постоянстве типа развития, и эпигенеза --- развития разнообразных структур из недифференцированного яйца. В течение ряда столетий, на протяжении которых идет этот поиск, высказано немало интересных идей и теорий. Согласно Л.~В.~Белоусову (1987), все это многообразие концепций в соответствии с ведущим принципом объяснения развития организма может быть подразделено на несколько групп. Л.~В.~Белоусов выделяет пять таких принципов, а именно, целевой или финалистический, типологический, исторический, каузально-аналитический и, наконец, синергетический.

**Финалистический принцип.** В соответствии с *финалистическим* принципом (Аристотель, 384 --- 322 до н. э.) процесс развития определяется целью, финалом, к которому он направлен: зачаток органа закладывается потому, что данный орган обязательно должен иметься у взрослой особи. Этот принцип объяснений из небиологического естествознания изгнан как ненаучный еще в XVII веке (Фрэнсис Бэкон, 1561 --- 1626). В эмбриологии же он в определенной



мере сохраняет свои позиции, подчеркивая предопределенность индивидуального развития.

**Типологический принцип.** *Типологический* принцип объясняет то или иное направление развития индивидуумов особенностями типа животных, к которому они относятся. Основываясь на этом принципе можно предсказать некоторые черты развития объекта на основании его принадлежности к тому или иному типу. Например, фундаментальной чертой позвоночных является закладка жаберных щелей. Можно смело предсказать, что у зародыша птицы, эмбрионы которой никогда не описывались, жаберные щели обязательно появятся на строго определенной стадии развития.

Разрабатывая проблему организации онтогенеза, Карл фон Бэр (1792 --- 1876) (рис. 0-2), прародитель современной эмбриологии, установил, что каждый тип организации животных (по Кювье, четыре типа: позвоночные, членистые, мягкотелые и лучистые) имеет свой особый план развития. При этом Бэр сформулировал *закон эмбриональной дивергенции*, состоящий в том, что общее для данного типа образуется в эмбриогенезе раньше, чем специальное. Сначала закладываются признаки, имеющие всеобщее распространение у представителей данного типа, затем более частные и лишь в последнюю очередь --- специальные. Обнаруженный Бэром принцип развития от общего к частному сохраняет в полной мере свое значение и в наше время. Им же постулирован и *закон зародышевого сходства*, согласно которому эмбрионы высшей формы данного типа никогда не походят на другую форму взрослого животного, но только на ее зародыш.

**Исторический принцип.** Важное место (и по затратам труда, и по достигнутым результатам) занимает *исторический принцип* объяснения движущих сил онтогенеза. Этот принцип был сформулирован, прежде всего, в трудах Чарльза Дарвина (1809 --- 1882), Фрица Мюллера (1821 --- 1897) и Эрнста Геккеля (1834 --- 1919). Сущность этого принципа состоит в том, что ход онтогенеза, последовательность его стадий объясняется историей происхождения вида, особенностями его эволюции. С этой точки зрения, эмбриональная дивергенция, отмеченная Бэром, отражает дивергенцию соответствующих видов в ходе эволюции, а общность зародышей разных видов

обусловлена общностью происхождения этих видов. Зародыши рассматриваются как «потускневший портрет» прародителя, так что и на основании данных о строении зародыша можно судить о предках данного животного. Примером такого рода «реставрации» могут служить исследования эмбриологии асцидий, выполненные А.~О.~Ковалевским (1866, 1871) (рис. 0-3), которые показали существование хорды у личинки асцидий, что позволило установить истинное положение асцидий в системе.

Одним из редких примеров довольно полной *рекапитуляции* филогенеза может служить исследованное Ф.~Мюллером развитие пальмового вора *Birgus latro*, ведущего наземный образ жизни ракообразного, близкого к ракам-отшельникам. Эмбриональное и личиночное развитие этого животного происходит в морской среде. После выхода из яйцевых оболочек свободноплавающей личинки *зоэа* и прохождения нескольких линек формируются молодые рачки с мягким изогнутым брюшком, которое они подобно ракам-отшельникам прячут в раковину моллюска. Следующий этап развития связан с выходом на сушу и соответствует филогенетической стадии наземных раков-отшельников. На дефинитивной стадии подгибание брюшка исчезает, и индивидуум приобретает свойства и черты пальмового вора. Таким образом, как полагают, онтогенез этих животных очень полно повторяет (рекапитулирует) филогенез данного вида, причем рекапитулируют не только морфологические особенности предковых форм, но и их инстинкты, характер питания и др.

В 1866 г. Эрнст Геккель (рис. 0-4) сформулировал *биогенетический закон*, согласно которому, онтогенез есть краткое повторение филогенеза. По мнению Э.~Геккеля, филогенез есть «механическая причина» онтогенеза. Отдавая должное плодотворности исторического метода изучения эмбриогенеза, нельзя не заметить, что последнее утверждение абсолютизирует роль исторического фактора и, по существу, отвергает причинный (каузальный) анализ реальных механизмов онтогенеза. Для современного исследователя очевидна ограниченность «закона» Геккеля. Ясно, что онтогенез в принципе не может быть кратким повторением филогенеза, так как сущность филогенеза состоит в формировании все новых и новых генотипов, правомочность существования

которых определяется естественным отбором, тогда как онтогенез --- это всего лишь реализация потенций существующего генотипа.

К утверждению о том, что онтогенез это краткое повторение филогенеза можно относиться лишь как к метафоре. Этот тезис идеализирует ситуацию даже, если к онтогенезу подходить с сугубо морфологической точки зрения. Действительно, обычно речь идет о рекапитуляции не всего онтогенеза, а лишь каких-либо отдельных признаков. Начиная с Э.~Геккеля, различают *палингенетические* (от греч. *πάλι* --- снова, опять; *γένεσις* --- творение, происхождение) и *ценогенетические* (от греч. *καίνος* --- новый) признаки (структуры). К первым относятся структуры, образование которых рекапитулирует органы предковых форм (например, хорда, жаберные щели у позвоночных). Ко вторым --- новоприобретенные структуры и признаки, дающие возможность зародышу приспособиться к условиям среды, в которой происходит развитие данного вида такие как, например, амнион, желточный мешок, аллантоис и др.

Сфера применения биогенетического закона для восстановления филогенетических отношений ограничивается также различного рода *гетерохрониями* --- изменениями в ходе эволюции времени закладки органов. При этом различают задержку, или *ретардацию*, (от лат. *retardatio* --- замедление) и ускорение, или *акселерацию* (от лат. *acceleratio* --- ускорение) закладки и развития органов. Аналогичное действие оказывают и *гетеротопии*, т.е. изменения области тела, в которой происходит закладка органа у данного вида сравнительно с предковой формой. Парадокс состоит в том, что эти, «затемняющие» биогенетический закон явления, и составляют значительную часть эволюционных преобразований, лежащих в основе филогении животных.

Исследования, опирающиеся на исторический принцип анализа движущих сил онтогенеза, сыграли важную роль в развитии современной эмбриологии. Они дали целый ряд крупных для своего времени теоретических обобщений, таких как теория зародышевых листков, теория происхождения многоклеточности у животных, теория филэмбриогенезов (см. подробнее гл. 14) и др., которые в известной мере сохранили свою актуальность до наших дней, хотя и нуждаются

в критическом переосмыслении с учетом современных данных биологии развития.

Неоценимая роль идей эволюционизма состояла и в том, что они дали мощный стимул дальнейшему развитию описательной эмбриологии. Именно во второй половине 19-го столетия описательная эмбриология открыла поразительное разнообразие форм эмбрионального развития и создала материальную основу эмбриологии, как науки. В развитии сравнительной и эволюционной эмбриологии выдающуюся роль сыграли многие российские исследователи, такие как А.~О.~Ковалевский, И.~И.~Мечников (рис. 0-5), К.~Н.~Давыдов, А.~Н.~Северцов, П.~П.~Иванов (рис. 0-6), и др. Описательная, или сравнительная, эмбриология в полной мере сохраняет свое значение и в наши дни. Современная описательная эмбриология располагает мощным и разнообразным арсеналом микроскопической техники, включая методы ультраструктурного анализа.

Важным направлением описательной эмбриологии, отчасти роднящим ее с экспериментальной эмбриологией, были исследования, ставившие своей целью проследить движения клеток и клеточных пластов эмбриона. Используя методы витального окрашивания или иные способы мечения зачатков, исследователи получили возможность следить за судьбой этих зачатков, за перемещениями клеток по зародышу, существенно обогатив таким образом арсенал методов описания развития. В. Фогт и его школа, впервые использовавшие метод маркирования клеток в 1930-ых годах, создали карты *презюмтивных* (от лат. *praesumptio* --- предположение) зачатков зародышей амфибий, проследив, какие органы возникают из тех или иных областей бластулы. Метод маркирования с использованием радиоактивных меток или флюоресцентных красителей широко используется и в современной эмбриологии. Вершин своего развития этот метод достиг при использовании генетического маркирования, которое предполагает трансплантацию зачатков, клетки которых легко обнаруживаются благодаря своей генетической природе и особому антигенному составу.

При всей важности и плодотворности исторического принципа нельзя не заметить, что при таком подходе поиск движущих сил эмбриогенеза в лучшем

случае выносятся за пределы развивающегося индивидуума, в филогенез. Внутренние причины и реальные механизмы контроля над клеточной репродукцией, дифференциацией и морфогенезом остаются вне внимания исследователей. Уязвимость этого подхода состоит и в том, что исследователи, сосредотачиваясь на анализе морфологии, пытаются найти ключ к пониманию развития структур, без учета истории становления и преобразования молекулярных и генетических механизмов этого развития. И если этот разрыв между структурой и механизмом ее развития был объективно неизбежен во второй половине XIX столетия, когда биология клетки и генетика находились в зачаточном состоянии, то в наше время, очевидно, что эволюцию индивидуального развития можно понять только при условии ясного представления об эволюции его молекулярно-генетических механизмов. Современная эволюционная эмбриология переживает естественный кризис, который, несомненно, будет преодолеваться по мере становления эволюционной биологии развития.

***Каузально-аналитический принцип.*** Открывшаяся, как полагали во второй половине XIX столетия, возможность воссоздания эволюционного древа Metazoa на основе биогенетического закона явилась мощным стимулом для сравнительно-эмбриологических исследований. Благодаря этому был накоплен огромный фактический материал, в том числе и характеризующий особенности раннего эмбриогенеза. Эти данные заложили основу для правильного понимания роли ядра и цитоплазмы в процессах индивидуального развития и в жизни клетки вообще. Именно изучение процессов гаметогенеза, оплодотворения и дробления у разных животных во многом способствовало формированию представлений о хромосомах и ядре, как носителях наследственных свойств.

Первое описание кариокинеза было сделано немецким зоологом Антоном Шнейдером в 1873 г. при исследовании дробления некоторых плоских червей. В 1874 году Отто Бючли описал веретено деления дробящихся яиц круглых червей и моллюсков. В 1882 г. вышел в свет классический труд Вальтера Флемминга (1843 --- 1905), в котором дается близкое нашим современным представлениям описание клеточных делений. Исследование бельгийского биолога Эдуарда ван-Бенедена (1845 --- 1910) дробления лошадиной аскариды

позволило ему сделать заключение о постоянстве числа и формы хромосом. В 1875 г. Оскар Гертвиг (1849 --- 1922) (рис. 0-7) установил, что сущность оплодотворения состоит в слиянии клеточных ядер сперматозоида и ооцита. Именно в эти годы была открыта редукция числа хромосом при гаметогенезе и его восстановление при оплодотворении. Все более убедительным становилось представление, что ядро является носителем наследственных свойств (О-Гертвиг, 1884). К концу столетия стало очевидным, что «удивительная формативная энергия зародыша не поступает в него извне, но является врожденным свойством яйца, унаследованным от родителей» (Э-Вильсон, 1900).

Поскольку в исходной точке начинающий свое развитие организм представлен одной клеткой, естественны попытки эмбриологов конца XIX столетия выяснить, какую роль в процессах индивидуального развития играют основные элементы клетки --- цитоплазма и ядро. Среди исследователей, пытавшихся при построении теории развития опереться на процессы, происходящие в самом зародыше, заметное место занимает Вильгельм Гис (1831 --- 1904). Гис был активным противником Геккеля. Он считал, что эволюционная теория не только ничего не дает для понимания проблемы развития зародыша, но просто запутывает ее. Гис сформулировал *принцип органообразующих областей зародыша*, каждая из которых связана с развитием определенных органов индивидуума. Он отвергал преформистские идеи прелокализации структур или специфического строительного материала, но, тем не менее, полагал, что цитоплазма яйца имеет некую пространственную организацию. Представление Гиса о зиготе, как о специализированной клетке с особым распределением материальных субстанций, важных для детерминации судьбы зачатков зародыша, легли в основу последующих исследований, которые действительно выявили в яйце особые цитоплазматические факторы формообразования (подробнее см. Главу 3).

Важную роль в становлении эмбриологии как науки сыграла *теория зародышевой плазмы* Августа Вейсмана (1834 --- 1914) (рис. 0-8). Эта теория была по существу первой научной попыткой объединить явления индивидуального развития и наследственности. Согласно этой теории (1883), хромосомы содержат особую плазму или идиоплазму (от греческого *ιδίος* ---

особый), которая представляет собой совокупность наследственных факторов. Эти факторы, или ядерные детерминанты, дискретны. Они контролируют выработку разных веществ, определяющих свойства цитоплазмы. При дроблении яйца и расхождении хромосом ядерные детерминанты распределяются неравномерно между дочерними клетками. Поскольку их воспроизведение, по Вейсману, не является обязательным, клетки дробящегося зародыша получают разные детерминанты, вследствие чего происходит их дифференциация (рис. 0-9). Идея о клеточной дифференциации, как следствии неравномерного распределения ядерных детерминант, диктовала необходимость раннего обособления линии половых клеток («зародышевый путь»), которые для поддержания преемственности поколений должны сохранять полный набор детерминант данного вида животного. Из теории Вейсмана вытекало два важных следствия. Одно из них состояло в признании принципиальной невозможности наследования признаков, приобретенных соматическими клетками. Второе --- в утверждении, что зародыш животного уже на ранних стадиях своего развития представляет мозаику клеток с различными наследственными факторами. Как известно в настоящее время, центральный постулат теории Вейсмана о неравнонаследственных делениях не соответствует действительности. Вместе с тем идея о генетическом «неравенстве» дифференцирующихся клеток сама по себе оказалась плодотворной и привела, в конечном счете, к открытию функциональной регуляции активности генов, как предпосылки детерминации и дифференциации клеток. Следует заметить, что А. Вейсман в качестве антитезы своей теории допускал и принципиально иную возможность, а именно, что эмбриональная дифференциация может быть обусловлена межклеточными взаимодействиями, что впоследствии привело к открытию явления эмбриональной индукции.

Наряду с теоретической разработкой проблемы факторов индивидуального развития 1880-ые годы ознаменовались возникновением новой отрасли --- экспериментальной эмбриологии. Основоположником этого направления по праву считается Вильгельм Ру (1850 --- 1924) (рис. 0-10). Ру дал концептуальное обоснование необходимости создания *механики развития*, как науки о движущих силах индивидуального развития, основанной на каузально-

аналитическом подходе к исследованию онтогенеза. Предметом каузально-аналитического направления, сосредоточенного на изучении «непосредственных» причин развития, стало осмысление роли физических и химических факторов, роли ядра и цитоплазмы, роли взаимодействий между клетками и зачатками зародыша. Для этого направления характерно стремление разложить сложные процессы развития на элементарные события и выяснить причинную связь между ними. В исследованиях такого рода широко используется воздействие на зародыш --- общее или локальное --- различными химическими и физическими факторами с целью усилить или подавить какие-то события и таким образом установить их значение в эмбриогенезе. Экспериментальная эмбриология, исповедующая каузально-аналитический принцип, широко использует разного рода преднамеренные нарушения естественных связей между клетками и зачатками органов методами микрохирургии.

В частности, применяются всевозможные *трансплантации* или пересадки зачатков в несвойственные им, или *эктопические*, области тела. Различают *гомо-* и *гетеротрансплантации* в зависимости от того, пересаживается ли зачаток реципиенту того же вида, что и донор, или же донору другого вида. При прослеживании судьбы изолированного зачатка часто используют методы *эксплантации* in vitro. Удаление или *экстирпация* зачатка применяется в тех случаях, когда исследуется вопрос о значении этого зачатка для нормального морфогенеза.

Для понимания роли межклеточных взаимодействий широко используется *диссоциация* зародыша или его органов на клетки и, наоборот, *агрегация* клеток разных типов в единую систему. Наряду с экстирпацией широко используется локальное уничтожение клеток путем облучения рентгеновскими, ультрафиолетовыми или лазерными лучами, а также специфическое выключение функций с помощью разного рода ингибиторов. На современном этапе развития экспериментальная эмбриология сохраняет свою принципиальную установку на раскрытие причинно-следственных отношений между различными событиями, наблюдаемыми в индивидуальном развитии. В арсенале ее средств появились не только модификации старых аналитических приемов с более высокой степенью разрешения, но и методики, позволяющие



экспериментатору вмешиваться непосредственно в транскрипционную активность генома, контролировать и регулировать ее.

Исследования характера изменения потенций клеток в раннем развитии, открывавшие путь к пониманию механизма клеточной дифференциации, на долгое время стали одной из центральных проблем эмбриологии. Представление о мозаичном характере дробления, которое предполагалось Гисом и постулировалось теорией Вейсмана, вытекало также и из опытов Вильгельма Ру. Ру установил, что плоскость первого деления дробления лягушки обычно соответствует медиальной плоскости, которая делит зародыш на две симметричные --- левую и правую --- части. Прижигая один из двух бластомеров раскаленной иглой, Ру обнаружил, что из неповрежденного бластомера развивалась половинная нейрула. Из этих опытов Ру сделал вывод, что зародыш лягушки представляет мозаику способных к автономной дифференциации частей, поскольку уже на стадии двух бластомеров каждая клетка снабжена специфическими неидентичными детерминантами. Впоследствии оказалось, правда, что результат опыта Ру был обусловлен сохранением остатка разрушенного бластомера, и что при изоляции бластомеров каждый из них способен дать начало целому индивидууму и что таким образом мозаичная теория неприложима к раннему развитию амфибий.

Уверенность в правильности или, по крайней мере, в универсальности мозаичной теории Вейсмана-Ру была поколеблена экспериментами Ганса Дриша (1867 --- 1941) (рис. 0-11), который изолировал бластомеры дробящегося яйца морского ежа или, сдавливая дробящееся яйцо, добивался смещения бластомеров в несвойственное им положение. Дриш показал, что изолированные бластомеры способны к формированию нормальных животных. После изоляции бластомеров на стадии двух или четырех клеток формировались личинки, которые отличались от нормальных животных лишь меньшими размерами. Способность к *эмбриональной регуляции*, т.е. к восстановлению нормального хода развития, была обнаружена и в опытах по изменению положения бластомеров дробящегося зародыша. Из экспериментов Дриша следовало, что развитие зародыша морского ежа, по крайней мере, на стадии раннего дробления, не носит мозаичного характера, что первые деления дробления равнонаследственны, а образующиеся бластомеры имеют

одинаковые потенциалы, т.е. *эквипотенциальны*. *Перспективная потенция* части организма оказалась более широкой, чем ее реальная судьба, которая находится в зависимости от положения клетки или зачатка в целостной системе и, возможно, обусловлена какими-то взаимодействиями с окружающими клетками или зачатками. Эксперименты Дриша поставили сложные проблемы перед эмбриологией, показав, что не все проблемы развития решаются в рамках однозначного детерминизма (Белоусов, 1987). Данные о том, что бластомеры яйца могут быть одновременно и частью целого, и целым, привели Дриша к *витализму*, к признанию некоей идеальной силы --- *энтелехии*, которая является носителем идеи целого и предопределяет целостность развивающегося организма независимо от того, развивается ли он из яйца или из его части. Историческое значение экспериментов Дриша несомненно. Они открыли принципиально новое явление и сыграли существенную роль в становлении современной биологии развития. Вместе с тем нельзя и абсолютизировать явление регулятивности. Регулятивность не является имманентным свойством зародыша. У некоторых животных она проявляется на ранних стадиях, но затем исчезает; у других она отсутствует изначально; у третьих она может появиться на относительно поздних стадиях онтогенеза.

Самые крупные достижения каузально-аналитической эмбриологии в первой половине 20-го столетия связаны с открытием явления *эмбриональной индукции*. Ганс Шпеман (1869 --- 1941) (рис. 0-12), его ученики и последователи показали, что дифференциация тканей и зачатков многих органов зародышей амфибий и других позвоночных животных имеет зависимый характер и возможна только при взаимодействии этих зачатков. В процессе индукции способная к восприятию индуцирующего сигнала компетентная ткань детерминируется под действием этого сигнала в строго определенном направлении. Развитие предстало в виде последовательного ряда индуктивных взаимодействий, в цепи которых завершение одного индуктивного события открывает возможности для реализации последующего. В результате этих исследований стало ясно, что представление о мозаичной автономной дифференциации, как единственном или, по крайней мере, главном способе определения судьбы частей развивающегося зародыша, не соответствует действительности.

Открытие взаимодействующих систем как фактора дифференциации поставило вопрос о природе сигналов, с помощью которых осуществляется это взаимодействие, а также о механизмах, генерирующих эти сигналы в нужное время и в нужном месте. Реальный прогресс в этой области наметился лишь во второй половине нашего столетия, когда с рождением молекулярной генетики было доказано, что управление всеми жизненными проявлениями клетки, ее метаболизмом и спецификацией ее функциональных белков связано с генами, которые ранее рассматривались лишь как факторы наследственности. Стало очевидно, что решение проблемы межклеточных взаимодействий в раннем эмбриогенезе лежит в плоскости раскрытия механизмов, с помощью которых осуществляется пространственно-временная регуляция активности генов.

В тридцатые годы прошлого столетия выдающийся эмбриолог и генетик Т. Морган (1866 --- 1945) (рис. 0-13) высказал убеждение, согласно которому в основе дифференциации зародыша лежит последовательное включение цепи генов. Активность более ранних генов предопределяет активность последующих генов каскада. В конечном счете, последовательное включение все новых и новых генов приводит к возникновению разнообразных признаков. Эта идея долгое время не воспринималась серьезно экспериментальной эмбриологией, как слишком абстрактная и далекая от реальных событий, происходящих в период эмбрионального развития. Открытие в середине прошлого столетия ДНК, ее роли в хранении и передаче наследственной информации, и, что особенно важно, в управлении биологической активностью клетки в корне изменило ситуацию. Хотя у некоторых животных в раннем онтогенезе дифференциация и может быть связана с необратимыми изменениями генома, в настоящее время общепризнанным является утверждение, что генеральный путь дифференциации зародыша обеспечивается дифференциальной экспрессией генов.

В предлагаемой книге мы постараемся показать, что морфологическое разнообразие животных формируется в процессе индивидуального развития. Мы постараемся также показать, что развитие животных во всех его проявлениях контролируется генетическими программами. Но если мы

докажем, что морфология животного возникает в процессе развития, а процесс развития контролируется генетическими программами, то мы приходим к неизбежному, и существенному, заключению, что *эволюция морфологии животных происходит на основе эволюции этих генетических программ.*

## ХАРАКТЕРИСТИКА ОСНОВНЫХ ЭТАПОВ ИНДИВИДУАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ

### ГЛАВА 1. ГАМЕТОГЕНЕЗ

Гаметогенез --- это процесс формирования половых клеток, способных при определенных условиях обеспечить воспроизводство новых особей. Гаметогенез играет исключительно важную роль, создавая необходимые предпосылки продолжения жизни.

Зрелые половые клетки, или *гаметы* (от греч.  $\gamma\alpha\mu\omicron\zeta$ --- свадьба, брак) представляют собой высокоспециализированные клетки, дифференциация которых связана как со специфическими изменениями ядерного аппарата и, прежде всего, с редукцией числа хромосом, так и с существенным преобразованием всей клетки в целом.

В ходе *оогенеза* (от греч.  $\omicron\omicron\nu$  --- яйцо;  $\gamma\epsilon\nu\epsilon\sigma\iota\zeta$  --- творение, происхождение), т.е. при формировании женских половых клеток, их специализация определяется, прежде всего, необходимостью создания запасов веществ, обеспечивающих энергетические потребности эмбриона до начала периода активного питания, которое становится возможным только по достижении относительно высокого уровня развития зародыша. У многих животных дифференциация женских половых клеток сопряжена с формированием анизотропии яйцевой клетки, в частности, с образованием ее первичной полярности. Неоднородность разных областей яйца обусловлена неравномерным распределением разного рода органелл, белков, иРНК и других соединений. Некоторые из этих веществ играют роль цитоплазматических детерминантов, т.е. факторов, предопределяющих направление дифференциации клеток, в которые они попадают при дроблении. В процессе оогенеза формируется сложно организованный цитоскелет, который необходим для дробления и перераспределения компонентов яйцевой клетки после ее активации.

Дифференциация мужских гамет, или *сперматогенез* (от греч. σπέρμα --- семя), характеризуется иной стратегией: она направлена на максимальную компактизацию ядерных структур, развитие органелл движения или иных органелл, обеспечивающих встречу и соединение спермия с яйцеклеткой.

У мужских и женских половых клеток глубокую специализацию претерпевает и поверхностный аппарат, который обеспечивает высокую точность распознавания родственных гамет противоположного пола. Специализированные плазматические мембраны гамет при определенных условиях создают возможность видоспецифического слияния гамет.

Одной из центральных проблем эволюционной биологии развития является вопрос о механизмах спецификации половых клеток. Организация процесса гаметогенеза обнаруживает поразительное разнообразие форм. По необходимости в учебнике могут быть изложены данные лишь по некоторым наиболее полно изученным объектам, но у читателя не должно создаться впечатление, что эти данные можно без оговорок экстраполировать на другие виды. Тем не менее, в процессе гаметогенеза можно выделить несколько последовательных этапов, каждый из которых имеет свои морфо-функциональные характеристики (рис. 1-1).

Клетки половой линии обычно обособляются на ранних этапах эмбрионального развития. Клетки, потомки которых дают начало исключительно гаметам, называются *примордиальными* (от лат. primordium --- начало, зарождение), или *первичными половыми клетками* (ППК). На более ранних стадиях иногда обнаруживаются *презюмтивные* примордиальные половые клетки, в результате асимметричных делений которых образуются клетки половой и соматической линий.

Известны два способа спецификации клеток половой линии: *эпигенетический*, при котором свойства половой клетки индуцируются внешними по отношению к клетке факторами, и *преформационный*, обусловленный материнскими детерминантами, унаследованными клеткой вместе с цитоплазмой ооцита (рис. 1-2).

Как свидетельствует распространение этих способов спецификации линии половых клеток, эпигенетический путь является первичным (Evitoux, Akam, 2003) (рис. 1-3).

ППК представляют собой диплоидные клетки, способные к митотическим делениям. У многих животных ППК способны к миграции и благодаря этому заселяют зачатки гонад, которые закладываются и формируются независимо, а иногда и на значительном расстоянии от мест возникновения половых клеток. ППК, заселившие зачатки гонад, называют *гониями*. Гонии, как и ППК, являются диплоидными и способны к митотическим делениям. Гонии мужских гонад называют *сперматогониями*, а женских --- *оогониями*. Этап развития, который представлен ППК и гониями, называют *периодом размножения* половых клеток, в отличие от следующего за ним *периода созревания*. В период созревания клетки полового пути теряют способность к митотическим делениям. Они вступают на путь превращения в гаплоидные клетки, претерпевая сложный процесс редукции числа хромосом. Редукция числа хромосом происходит в ходе так называемого мейоза (от греч. μέιωσις --- меньше).

Мейоз включает два последовательных деления, которые называются мейотическими, или делениями созревания. Половые клетки, вступившие на путь делений созревания, называют «*цитами*»: соответственно в мужских и женских гонадах различают *сперматоциты* и *ооциты*. До завершения первого деления созревания половые клетки называют *первичными сперматоцитами* (*ооцитами*) или *сперматоцитами* (*ооцитами*) *первого порядка*. После первого деления созревания их называют --- *вторичными сперматоцитами* (*ооцитами*) или *сперматоцитами* (*ооцитами*) *второго порядка*. После завершения деления созревания вторичный ооцит называют зрелой яйцевой клеткой. Вторичный сперматоцит в результате второго деления созревания образует гаплоидную сперматиду. В процессе сперматогенеза различают особый *период формирования*, в течение которого сперматиды преобразуются в зрелый сперматозоид.

### **1.1. Сегрегация линии половых клеток. Первичные половые клетки.**

Клетки-родоначальницы половых клеток, или примордиальные половые клетки, часто обособляются на самых ранних этапах эмбрионального развития. Например, у животных, входящих в состав группы типов Ecdysozoa, различия между клетками полового пути и соматическими клетками обычно обнаруживается уже в ходе первых делений оплодотворенного яйца.

У некоторых животных в ходе делений дробления в некоторых клетках происходит отбрасывание части материала хромосом, или *диминуция хроматина* (от лат. *diminuo* --- расщеплять). Явление диминуции хромосом впервые наблюдал Т.~Бовери у нематоды *Ascaris megalocephala* (1887). Уже в самом начале развития, когда зародыш находится на стадии двух бластомеров, хромосомы одного из них фрагментируются, и концевые их части отбрасываются (рис. 1-4). Как показал дальнейший анализ, из бластомера, где произошла диминуция, возникают соматические клетки. Бластомер с неповрежденными хромосомами при следующем делении вновь обнаруживает диминуцию хроматина в одном из своих потомков. И в этом случае клетка с неполными хромосомами дает начало лишь соматическим тканям. Диминуция повторяется еще в двух клеточных генерациях, после чего возникает клетка-родоначальница клона половых клеток, которые отличаются от соматических сохранением полноценных хромосом. Все соматические ткани возникают из бластомеров, хромосомы которых подверглись диминуции. Учитывая сказанное, можно предположить, что информация, содержащаяся в отбрасываемых частях хромосом, важна исключительно для гаметогенеза, но не затрагивает дифференциацию и функционирования клеток сомы. Аналогичные данные были получены и в отношении некоторых других аскарид. Диминуция хроматина описана также у плавунца *Dytiscus*, а среди позвоночных у некоторых миксин.

У нематоды *Caenorhabditis elegans* диминуция хроматина не происходит. Тем не менее, обособление клеток половой линии прослеживается, начиная с первого деления дробления. В яйце *C. elegans* имеются полярные или Р гранулы, которые содержат специфический антиген и поэтому легко выявляются иммуноци



тохимически (рис. 1-5).

Перед началом дробления Р гранулы, которые до оплодотворения равномерно распределены по ооциту, концентрируются на одном полюсе яйца, маркируя будущий задний конец зародыша. В ходе первых делений дробления Р гранулы последовательно сегрегируются в примордиальных половых клетках ( $P_0 \rightarrow P_1 \rightarrow P_2 \rightarrow P_3 \rightarrow P_4$ ) и, в конечном счете, попадают в клетки-предшественницы первичных половых клеток. Прямое участие этих гранул в дифференциации половых клеток не доказано. Установлено, однако, что все выявленные до настоящего времени белки Р гранул обладают способностью связывать РНК. В связи с этим высказывается предположение, что материал Р гранул влияет на регуляцию метаболизма иРНК в цитоплазме клеток половой линии, который имеет иной характер по сравнению с соматическими клетками. Оказалось, что у *C. elegans* бластомеры половой линии в отличие от бластомеров, дающих соматические зачатки, не синтезируют иРНК вплоть до стоклеточной стадии, когда обособляются две первичные половые клетки Z2 и Z3. Подавление экспрессии генов в клетках половой линии объясняется действием материнских факторов, в том числе действием белка PIE-1. Действительно, при мутации материнского гена *pie-1* у зародышей вместо бластомера половой линии P3 после третьего деления дробления образуется соматическая клетка (рис. 1-6).

Нечто подобное описано у ракообразных. Например, у некоторых копепод в период дробления при митотических делениях происходит асимметричное распределение особых телец, *эктосом*, которые маркируют клетки половой линии вплоть до образования первичных половых клеток (рис. 1-7).

У многих насекомых в процессе гаметогенеза ооцит дифференцируется таким образом, что цитоплазма той области яйца, где впоследствии возникнут задние структуры зародыша приобретает свойства, предопределяющие формирование первичных половых клеток. Эту цитоплазму называют *полярной плазмой*.

Например, у некоторых галлиц в период дробления в ядрах будущих соматических клеток происходит элиминация большинства хромосом. Элиминация хромосом в линии половых клеток не происходит, так как она

предотвращается специфическими факторами, сосредоточенными в полярной плазме задней области ооцита (рис. 1-8).

Полярная плазма ооцита насекомых играет важную роль в первичном программировании пути развития (спецификации) первичных половых клеток и в тех случаях, когда элиминация хромосом не происходит. Уже в начале 20-го столетия было известно, что разрушение задней области яйца приводит к дефектам развития половых клеток и вызывает стерильность насекомых. Особенно подробно формирование клеток полового пути было изучено у Дрозофилы. Оказалось, что полярная плазма ооцитов Дрозофилы содержит особые, выявляемые с помощью электронного микроскопа, состоящие из РНК и белка гранулы, которых нет в других областях яйца. Облучение ультрафиолетом задней области яйца вызывает стерилизацию животных. Однако инъекция полярной плазмы, взятой из необлученного яйца, в облученное --- восстанавливает способность зародыша формировать нормальные половые клетки (Рис. 1-9). Доказательство того, что в полярной плазме яйца Дрозофилы локализованы факторы, необходимые для дифференциации половых клеток, вытекает из экспериментов по трансплантации полярной плазмы (Ilmensee, Mahowald, 1974).

Ильменси и Маховолд инъецировали полярную плазму яйца дрозофилы дикого типа (форма А, рис. 1-10) в переднюю область яйца генетически маркированной формы В, имеющей мутации *multiple wing hair* и *ebony (mwh, e)*. В этом случае закладка половых клеток под влиянием полярной плазмы происходила не только в задней области, как обычно, но и в передней области зародыша. Для того чтобы эти половые клетки смогли попасть в гонады и превратиться в зрелые гаметы, их пересаживали из передней в заднюю область зародышей генетической формы С (например, *yellow* или *white*). Часть прооперированных зародышей завершила развитие и дала фертильных животных, гаметы которых имели не только ожидаемый генотип С, но и генотип В. Таким образом, эти опыты отчетливо показали, что полярная плазма яйца дрозофилы формы А инициировала образование половых клеток на переднем конце яйца дрозофилы формы В (Рис. 1-10).

Участие полярной плазмы в детерминации половых клеток Дрозофилы подтверждается и данными анализа ряда мутаций, при которых образуется стерильное потомство. Так, у гомозиготных мутантных самок *grandchildless*, скрещенных с нормальными самцами, потомство стерильное. У этих мутантов ядра дробящегося яйца не мигрируют в заднюю область яйца, в результате чего формирование половых клеток становится невозможным. При мутации *agametic* наблюдается быстрый распад гранул полярной плазмы и резкое уменьшение числа половых клеток.

Состав полярной плазмы ооцита Дрозофилы довольно сложен. Она отличается содержанием большого количества митохондрий, фибрилл и гранул. Важными составными элементами полярной плазмы служат белок GCL (*Germ cell-less*), белки Oskar, Nanos и Vasa, митохондриальная РНК и нетранслируемая РНК, с которой связана способность половых клеток к миграции. Непосредственное участие в спецификации половых клеток Дрозофилы принимает белок GCL. Соответствующая иРНК синтезируется под контролем гена *gcl* в период гаметогенеза в цистocyтaх(см. стр. NB), транспортируется в ооцит и концентрируется здесь в задней полярной области. Транспортировка иРНК<sup>*gsl*</sup>, иРНК<sup>*oskar*</sup>, а также белка Staufen в заднюю область ооцита блокируется при мутации генов *sappuccino* и *spire*. Синтез белка GCL происходит вскоре после оплодотворения. Предполагается, что молекулы этого белка инициируют процессы, обеспечивающие развитие половых клеток. В спецификации половых клеток каким-то образом участвует и белок Oskar. Во всяком случае, эктопическая инъекция иРНК<sup>*oskar*</sup> вызывает появление половых клеток в несвойственных местах.

Интригующие данные были получены японскими исследователями Кобаяши и Окада (1989), которые установили, что компонентом полярной плазмы Дрозофилы является также рибосомальная РНК митохондрий (mtrРНК), которая входит в состав полярных гранул. Если зародышам, которые были облучены ультрафиолетом в дозах, подавляющих гаметогенез, инъектировать mtrРНК, то формирование половых клеток восстанавливается. В состав полярных гранул входит и некая нетранслируемая РНК, инактивация которой с помощью

соответствующей антисмысловой РНК делает первичные половые клетки Дрозофилы неспособными к миграции в гонаду.

Характерной морфологической особенностью первичных половых клеток многих животных является наличие так называемых перинуклеарных телец. Они описаны у кишечнополостных, нематод, полихет, щетинкочелюстных, асцидий, ланцетников, практически всех позвоночных. В большинстве случаев эти образования в настоящее время скорее могут служить лишь маркерами клеток половой линии, поскольку прямые экспериментальные доказательства их детерминирующих свойств отсутствуют. В отношении некоторых животных имеются лишь косвенные свидетельства возможной роли цитоплазматических факторов в спецификации клеток половой линии. Например, имеются данные о том, что у бесхвостых амфибий облучение ультрафиолетом вегетативной области яйца, где сосредоточены половые гранулы (рис. 1-11), ведет к стерилизации развивающегося животного.

Раннее обособление клеток половой линии не является универсальным правилом. Часто линия половых клеток возникает на сравнительно поздних стадиях дробления или даже в период гастрюляции. Среди позвоночных первичные половые клетки на стадии дробления были выявлены лишь у бесхвостых амфибий, у которых они образуются в тесной связи с энтодермой. В отличие от этого у хвостатых амфибий ППК, как полагают, возникают в период гастрюляции благодаря индуцирующим воздействиям энтодермы, т.е. эпигенетически. Эпигенетический характер формирования ППК описан и у млекопитающих. У мыши возникновение половых клеток, которые маркируются высоким содержанием щелочной фосфатазы (Everett, 1945), обнаружено на стадии 6,5 суток после спаривания. ППК появляются в эпибласте задней области зародыша в результате индуцирующего действия факторов ВМР (подробнее см. том 2).

У зародыша человека ППК возникают на стадии 16 сомитов. При некоторых экспериментальных условиях ППК можно получить и из зачатка нейроэктодермы, из которого при нормальном развитии они никогда не образуются. По-видимому, у млекопитающих спецификация ППК также

осуществляется в результате индуцирующих влияний факторов внутренней среды.

Первичные половые клетки обычно обладают амебоидной подвижностью. Благодаря этому ППК мигрируют от места своего возникновения до зачатка гонады, который они заселяют. Миграция половых клеток обычно носит *активный* характер. Продолжая митотически делиться, первичные половые клетки преодолевают значительные расстояния, выбирая направление движения на основе *контактного ориентирования*. Например, у млекопитающих ППК перемещаются в период миграции от основания аллантаоиса по дорсальному мезентерию в область половых гребней и, заселяя их, способствуют образованию гонад. В период миграции ППК активно делятся, благодаря чему численность популяции ППК возрастает примерно от ста клеток до пяти тысяч.

У амфибий ППК, которые образуются в энтодерме (Ксенопус), или в мезодерме (Тритон) движутся в направлении половых валиков по внеклеточному матриксу мезентерия. Направление миграции ППК предопределяется предварительной разметкой пути движения, который устанавливается благодаря ориентированному расположению нитей *фибронектина*. Действительно, обработка мезентерия антителами против фибронектина предотвращает миграцию ППК.

У рептилий и птиц ППК, возникающие из клеток эпибласта, мигрируют в в гипобласт на переднем краю *area pellucida* (см. гл. 13) и образуют здесь скопление, имеющее вид полумесяца. Из этой области ППК пассивно перемещаются в составе гипобласта в переднем направлении, а затем по кровеносным сосудам зародыша вместе с током крови. В области зачатка гонад наблюдается активное выселение ППК (*diapedез*) из кровеносных сосудов (рис. 1-12). Причину этого локализованного выселения связывают с особыми свойствами эндотелия кровеносных сосудов в области зачатка половой железы или же с хемотаксическим действием каких-то факторов, вырабатываемых в этом зачатке.

## 1.2. Гонии

ППК, заселившие гонады, называют *гониями*. У многих животных, выявлены особые *стволовые половые клетки* (СПК), которые поддерживают непрерывность гаметогенеза в течение долгого периода времени, а то и на протяжении всей жизни животных. Различают два типа СПК - *стереотипный* и *популяционный*. Стволовые клетки первого типа характеризуются асимметричным делением, в результате которого одна из дочерних клеток остается стволовой, а другая вступает на путь дифференциации. Например, у Дрозофилы стволовая клетка, которая находится в терминальной области гермария яйцевой трубки (рис. 1-17), делится и образует две клетки: *дочернюю СПК*, сохраняющую контакт с апикальными соматическими клетками терминальной нити, и *цистобласт*, клетку, последующие деления которой дают ооцит и связанные с ним цистоциты. При делении СПК популяционного типа образуются две равнозначные клетки, судьба которых предопределяется случайным образом в зависимости от местоположения клетки в яйцевой трубке. Так, у *C. elegans* те клетки, которые окажутся расположенными близ дистальной концевой клетки трубчатой гонады, сохраняют способность к митотическим делениям. Эта способность поддерживается сигналами, исходящими из концевой клетки. По мере удаления гоний от источника сигнала, поддерживающего митотическую активность, клетки переходят к дифференциации и вступают в фазу мейоза. Митогенный сигнал концевой клетки опосредуется геном *glp-1* (рис. 1-13). Мутация этого гена ведет к резкому снижению уровня пролиферации гоний. Так, в семенной трубке *C. elegans* при рецессивной мутации *glp-1* вместо примерно полутора тысяч образуется всего лишь около десятка спермиев.

У зародышей мыши гонии, заселившие зачатки яичника, продолжают размножаться, существенно увеличивая число женских половых клеток. Наибольшее число оогоний наблюдается у 13,5-суточных зародышей, когда гонии прекращают митотические деления и вступают в мейоз, становясь ооцитами. Идентичные процессы происходят и в яичнике плода человека, где пик числа оогоний (около  $7 \times 10^6$ ) приходится на 20-ую неделю беременности.

Следует заметить, что у родившихся особей женского пола млекопитающих число ооцитов значительно меньше. Ко времени рождения мышей, крыс и человека более 2/3 пула потенциальных женских половых клеток уничтожается путем апоптоза. У женщин при рождении имеется около одного миллиона ооцитов, при достижении половой зрелости их остается меньше  $4 \times 10^5$ , а к 50-ти годам менее  $1 \times 10^3$ , т.е. к этому моменту погибает 99,9% ооцитов, имевшихся в яичниках при рождении.

### **1.3. Мейоз**

Деления созревания, или мейотические деления являются обязательным событием в развитии гамет животных. В результате двух последовательных мейотических делений происходит редукция числа хромосом, и образуются гаплоидные гаметы. Вступившие в мейоз половые клетки называют сперматоцитами и ооцитами. В процессе мейоза кроме редукции числа хромосом осуществляется комбинативная изменчивость генома половых клеток. Эта изменчивость достигается, во-первых, за счет случайного распределения родительских хромосом по дочерним клеткам, и, во-вторых, за счет рекомбинации участков гомологичных хромосом, происходящей в ходе кроссинговера.

Переключение с митотических делений, характерных для гоний, на мейоз находится под контролем многих генов и, в частности, генов, контролирующих репликацию ДНК. Премейотический синтез ДНК, которым начинается этот период гаметогенеза, заметно отличается по ряду параметров от обычного синтеза ДНК, предшествующего митозу. Эти отличия проявляются не только в большей продолжительности периода премейотической репликации ДНК, но и в иной последовательности репликации отдельных участков ДНК. Завершение премейотического синтеза ДНК может происходить после существенной паузы --- уже в профазе мейоза. В мейозе имеет место лишь одна фаза синтеза ДНК и два (первое и второе) мейотических деления. Мейотические деления подразделяются, как и в случае митоза, на профазу, метафазу, анафазу и телофазу.

В профазе первого мейотического деления (первичные ооциты и первичные сперматоциты) различают несколько последовательных стадий. На стадии *лептотены* вследствие начавшейся конденсации хроматина появляются тонкие нити хромосом, состоящих из двух хроматид. Затем следует *зиготена*, стадия, на которой с помощью особого *синаптонемного комплекса* осуществляется попарное соединение гомологичных хромосом или их конъюгация. Попарно соединенные хромосомы --- биваленты отчетливо видны на стадии толстых нитей (*пахитена*). На стадии зиготены --- пахитены начинается *кроссинговер* (от англ. crossing-over --- перекрест). Разрушение синаптонемного комплекса и расхождение гомологов происходит на стадии двойных нитей (*диplotена*). Гомологичные хромосомы в это время связаны между собой лишь в области хиазм. Завершается профаза мейоза стадией конденсации бивалентов, состоящих из четырех хроматид. Сестринские хроматиды связаны центромерными областями, а хроматиды гомологов --- хиазмами. Эту стадию называют *диакинезом*.

Процесс мейоза находится под строгим генетическим контролем. Так, например, образование синаптонемного комплекса у мыши связано с экспрессией гена *Sycp1*. Кодированный им белок необходим для построения центрального элемента комплекса и сперматоцитов, и ооцитов. Экспрессия одного и того же гена *Sycp1* у мужских и женских особей обеспечивается благодаря существованию у этого гена специфических "мужского" и "женского" промоторов.

У млекопитающих первое мейотическое деление ооцитов обычно имеет весьма продолжительную профазу, так как они в своем развитии останавливаются на стадии диакинеза. На этой стадии первичные ооциты окружаются специализированными соматическими клетками (*прегранулеза*) и образуют *первичные фолликулы*. Стадия диакинеза может продолжаться годы (у человека до 50 лет).

Вслед за профазой следуют мета-, ана- и телофаза первого мейотического деления. После завершения первого мейотического деления образуются вторичные сперматоциты и ооциты. Ранее полагали, что именно первое деление



созревания является редукционным вследствие расхождения гомологичных хромосом, тогда как второе деление, следующее за первым без дополнительного синтеза ДНК, является эквационным, в ходе которого расходятся хроматиды (рис. 1-14). В действительности, в ходе и первого, и второго мейотического деления в одних бивалентах расходятся гомологичные хромосомы (редукционное деление), а в других --- хроматиды (эквационное деление).

В ходе мейоза осуществляется не только редукция числа хромосом. Благодаря случайному характеру распределения гомологичных хромосом по клеткам возможное число генетических комбинаций при гаметогенезе равно  $2^n$ , где  $n$  --- число пар хромосом. Так, у человека каждая особь может дать теоретически около 8,5 миллионов ( $2^{23}$ ) генетически различающихся типов гамет. Учитывая же кроссинговер, можно сказать, что это разнообразие практически бесконечно.

#### **1.4. Оогенез**

Процесс развития женских половых клеток, или оогенез, сопряжен со сложными структурными и функциональными перестройками ядра, цитоплазмы и поверхностного аппарата клетки. В ходе оогенеза наряду с мейотическими преобразованиями ядра происходит интенсивное накопление энергетически богатых и пластических веществ, которые обеспечивают высокую скорость развития и известную автономность зародышей до начала периода активного питания. В период оогенеза формируются механизмы, необходимые для оплодотворения и активации яйца, а также для блокировки полиспермии. Процесс оогенеза иногда называют проэмбриональным периодом, так как в это время под контролем материнского генома происходит выработка разного рода морфогенетически активных веществ, специфическая локализация которых в ооците во многом предопределяет характер развития и полярность зародыша после оплодотворения. Наконец, в период оогенеза формируются разнообразные оболочки яйца, которые выполняют защитную функцию, а в период оплодотворения обеспечивают начальные этапы взаимодействия яйца со сперматозоидом. В результате оогенеза образуется яйцо, т.е. ооцит, окруженный системой оболочек.

##### **1.4.1. Яйцевые оболочки**

В зависимости от способа образования различают *первичные, вторичные и третичные* яйцевые оболочки. Первичными оболочками называют оболочки, продуцируемые самими яйцеклетками; вторичными --- оболочки, которые формируются за счет активности фолликулярных клеток яичника; третичными --- структуры, которые образуются при участии желез половых протоков самки.

Примером первичной оболочки может служить желточная оболочка, которая располагается непосредственно на поверхности ооцита и является по своей сути надмембранным комплексом клетки. Как видно на рис. (рис. 1-15), желточная оболочка полихеты *Nereis virens* имеет сложную структуру. Она построена из фибриллярного материала гликопротеиновой природы и характеризуется эластичностью и способностью к растяжению. Наружный отдел желточной оболочки богат полисахаридами. Оболочка пронизана каналами, через которые проходят микроворсинки ооцита. У рыб первичную оболочку называют *лучистой оболочкой* или *zona radiata*. Иногда желточной оболочкой называют образования, имеющие более сложный генезис. Например, у земноводных, птиц и млекопитающих желточной оболочкой называют структуру, в образовании которой участвуют и ооцит, и клетки фолликулярного эпителия. У млекопитающих эту сложную оболочку называют оолеммой, или блестящим слоем (*zona pellucida*).

Вторичные оболочки хорошо развиты у наземных или пресноводных животных, хотя имеются и у животных, ведущих морской образ жизни, например, у головоногих моллюсков. К вторичному типу оболочек относится, например, хорион мечехвостов, паукообразных, ракообразных и насекомых. *Хорион* представляет собой плотную, эластичную или жесткую оболочку, которая иногда имеет характер скорлупы. Белок хориона --- хорионин--- по своему химическому составу близок роговому веществу. Как правило, хорион --- многослойное образование, которое подразделяется на относительно тонкий внутренний отдел --- *эндохорион*, и толстый внешний *экзохорион*. Например, хорион палочника *Bacillus libanicus* состоит из эндохориона, толщиной около 7~мкм, и семислойного экзохориона, достигающего 50~мкм. Для проникновения сперматозоида в хорионе имеется канал, открывающийся наружу отверстием --- микропиле.

Третичные оболочки яйца формируются обычно у животных с внутренним осеменением. Их образование происходит в половых протоках самки после овуляции и оплодотворения. К числу третичных оболочек относятся, например, белковые, пленчатые подскорлуповые и известковая оболочки яйца птиц.

#### 1.4.2. Пути формирования энергетических запасов

Как следует из схемы (рис. 1-16), процесс эмбрионального развития, подобно любому иному биологическому процессу, может осуществиться только при наличии источников энергии. В раннем развитии различаются два типа источников энергии: внутренние и внешние. Доступность *внешних* источников определяется временем дифференциации органов, которые обеспечивают возможность перехода на активное питание. Использование зародышем внешних источников питания наблюдается при паразитизме, когда эмбриональное развитие происходит в тканях хозяина, а также в случае живорождения, когда питание зародыша обеспечивается материнским организмом. *Внутренние* энергетические источники создаются в период оогенеза путем накопления в яйце энергетически богатых веществ (желток, липиды и др.). Кроме *прямого* может быть и *косвенный путь* накопления энергии в яйце. Действительно, в период роста яйца происходит образование большого количества органелл, синтез или сборка которых требует больших энергетических затрат. О масштабах запасов веществ и органелл можно судить, например, по соотношению этих компонентов в яйцевой клетке и клетки печени шпорцевой лягушки *Xenopus laevis* (Таблица). Продукция больших количеств митохондрий, рибосом, ДНК- и РНК-полимераз и других энергоемких соединений в период оогенеза освобождает эмбриональный период развития от соответствующих энергетических затрат.

**Таблица. Примерное соотношение количества некоторых органелл и соединений в яйце и клетке печени *Xenopus laevis*.**

Компонент	Яйцеклетка / Клетка печени
Белок	300000:1

рибРНК	200000:1
Митохондрии	100000:1
РНК-полимеразы	100000:1
ДНК-полимераза	100000:1
Гистоны	15000:1
tРНК	10000:1

Создание необходимого запаса энергоемких структур и веществ в яйцевой клетке сопряжено с существенным увеличением размеров яйца. Если принять за единицу диаметр «средней» соматической клетки взрослого животного (15~мкм), то диаметр яйца морского ежа (150~мкм) превосходит его на порядок, диаметр яйца лягушки (примерно 1500~мкм) в 100 раз, а яиц рептилий и птиц более чем в 1000 раз. У птиц 95% массы яйца составляет так называемый желток.

Объем запасов энергетических и пластических веществ в яйце зависит от сложной комбинации многих условий, которые у данного вида иногда могут действовать в противоположных направлениях. Среди факторов, влияющих на объем запасаемых веществ, можно назвать время достижения стадии, когда становится возможным активное питание. Чем раньше наступает активное питание, тем меньше требуется запасов в яйце. Другим фактором является высота организации животного. При прочих равных условиях более сложная структурная организация животного требует большего времени для своего развития, и, соответственно, больших запасов энергии и пластических веществ. Существенное значение имеет характер трофических связей зародыша с окружающей его средой. При паразитическом развитии, когда зародыш питается за счет хозяина, объем запасов в яйце минимален. Аналогичная картина наблюдается и при внутриутробном развитии.

### **1.4.3. Типы оогенеза**

Формирование таких гигантских образований, какими являются яйцевые клетки, требует особых механизмов, необходимых для преодоления ограниченных возможностей матричной активности генома диплоидной клетки. Сравнение организации оогенеза у представителей разных групп животных

показывает, что это ограничение обычно преодолевается за счет интеграции метаболической активности многих сотен и даже тысяч клеток, как половой, так и соматической природы. Проявления этого *принципа кооперативности* весьма разнообразны.

Хотя у некоторых групп животных имеется так называемый солитарный тип оогенеза, при котором синтез желточных включений происходит непосредственно в ооците, генеральной линией эволюции оогенеза является вынесение синтеза вителлогенина, белка-предшественника желточных включений, за пределы гонады. У позвоночных с высоким уровнем синтеза вителлогенина его выработка происходит в клетках печени. Общая схема регуляции этого процесса представлена на рис. 1-17. Под действием гипофизарного гонадотропина в фолликулярных клетках яичника образуется эстроген, наличие которого служит сигналом для инициации синтеза вителлогенина в клетках печени. Этот предшественник желтка с током крови транспортируется в яичник, где клетки фолликулярного эпителия, по-видимому, при действии фолликулстимулирующего гормона осуществляют перенос этого белка в ооцит. У насекомых синтез вителлогенина происходит в клетках жирового тела, при действии гормона, также вырабатываемого фолликулярным эпителием яичника, который, в свою очередь, стимулирован фолликулотропным гормоном, продуцируемым особым нейросекреторным органом --- *corpora allata*. У полихет описан синтез вителлогенина в целомацитах под действием гормона головного ганглия (рис. 1-17). Таким образом, у представителей всех трех групп билатеральных животных синтез вителлогенина происходит вне гонады. Поскольку он осуществляется негомологичными структурами, эти данные свидетельствуют о независимом, параллельном возникновении у *Lophotrochozoa*, *Ecdysozoa* и *Deuterostomia* внегонадного синтеза основного по своей массе белка, необходимого для оогенеза, что, безусловно, говорит о высоком адаптивном значении такой организации вителлогенеза.

Разные типы устройства гонад и организации оогенеза являются одной из причин большого многообразия яйцевых клеток животных. Бросается в глаза, в частности, разнообразие форм яиц, связанное с пространственной локализацией

желточных и иных трофических включений. Как правило, животные имеют *эндолецитальные* яйца, у которых желток сосредоточен внутри ооцита. По характеру локализации желточных включений различают *изолецитальные* (гомolecитальные) *телolecитальные* и *центролецитальные* яйца. Изолецитальными называют такие яйца, у которых желток равномерно распределен в яйце; телolecитальные --- характеризуются концентрацией желтка у одного из полюсов яйца; к центролецитальным относят такие яйца, у которых плотные желточные включения сосредоточены в центральной области, тогда как цитоплазма, свободная от включений, располагается преимущественно на периферии яйца. По количеству желтка различают *алецитальные* (без желтка), *олиголецитальные* (с малым содержанием желтка), *мезолецитальные* (с умеренным содержанием желтка) и *полилецитальные* (с большим содержанием желтка) яйца. Иногда, если желтка в яйце очень мало, как, например, в яйцах *Eutheria*, говорят об *алецитальных* яйцах, хотя в этом случае было бы точнее говорить об *олиголецитальных* яйцах, содержащих все же небольшое количество желтка. Тем не менее, в некоторых случаях образуются действительно алецитальные --- безжелтковые --- ооциты. Например, среди плоских червей различают две группы, каждая из которых характеризуется своеобразной стратегией энергетического обеспечения раннего развития. Одна группа (*Acoela*, *Polycladida* и др.) представлена животными с типичными эндолецитальными яйцами, у которых желток сосредоточен в ооците. У плоских червей другой группы (*Tricladida*, паразитические классы) ооциты лишены желтка. Развитие в этом случае обеспечивается особыми *желточными клетками*, которые находятся в окруженной оболочкой капсуле вместе с яйцом (рис. 1-18). В соответствии с этим плоские черви подразделяются на группу архоофора (примитивный тип с эндолецитальными яйцами) и группу неоофора с *эктолецитальными* яйцами. У представителей неоофора наряду с яичником имеются особые желточные железы, продуцирующие желточные клетки. Ооцит по яйцеводу и желточные клетки по желточным протокам поступают в бурсу, где после осеменения яйцо вместе с желточными клетками окружается капсулой и далее через яйцезелточный проток выводится наружу (рис. 1-16). Естественно, указанные группы животных имеют разные программы раннего развития. Нечто аналогичное наблюдается у немертины *Lineus ruber*, у которой некоторые яйца, из

отложенных в коконе, служат питающими клетками и потребляются другими особями данного кокона.

В ооцитах многих животных, например, у плоских, круглых и кольчатых червей, моллюсков, членистоногих, иглокожих и хордовых, в том числе у ланцетника, миног, осетровых и костистых рыб, амфибий, рептилий, млекопитающих в ходе оогенеза происходит накопление особых кортикальных гранул, которые формируются при участии элементов Гольджи. Сначала они рассеяны по всей цитоплазме, но на завершающих этапах оогенеза концентрируются в кортикальной области ооцита. Обычно это сравнительно мелкие пузырьки, диаметром до 1~мкм, но у осетровых они достигают 3-4~мкм, а у костистых рыб, где они называются кортикальными альвеолами, --- даже 30-40~мкм. Кортикальные гранулы содержат разного рода ферменты, сульфомукополисахариды и другие вещества, которые играют важную роль в процессе оплодотворения (см. главу 2).

Среди большого многообразия типов оогенеза: наиболее часто встречаются *диффузный*, *солитарный*, *полигеномный* и *гипертранскрипционный* оогенез. Диффузный тип оогенеза встречается у низших Metazoa. Для него характерны ооциты с амебоидной подвижностью и способностью к фагоцитозу. Солитарный тип оогенеза с автономным синтезом макромолекул в ооците имеет весьма ограниченное распространение. Полигеномный тип оогенеза можно рассматривать как своеобразное проявление принципа кооперативности. Для этого типа характерно подключение к формированию яйцевой клетки большого числа однотипных геномов. В ходе эволюции неоднократно и независимо возникал неполный цитокинез митотически делящихся гоний, в результате чего последние формировали синцитиальную структуру. Один из элементов синцития становился ооцитом. Все остальные --- вспомогательными клетками. Полигеномный тип оогенеза с синцитиальными клеточными клонами, формирующимися из клеток половой линии, описан у некоторых кишечнополостных (рис. 1-19), гребневиков, аннелид, насекомых, у отдельных видов позвоночных. Неполный цитокинез, характерный для полигеномного типа оогенеза, в процессе эволюции иногда трансформировался в эндомитоз, в результате которого возникали многоядерные ооциты. Такие полигеномные ооциты

описаны у хвостатой лягушки *Ascaphus truei* (гладконог). У сумчатой лягушки *Flectonotus pygmaeus* ооциты насчитывают до 3000 ядер, из которых лишь одно становится женским пронуклеусом. Возможно образование многоядерности и за счет слияния многих ооцитов, что наблюдается, например, у аннелиды *Dinophilus*.

У Ктенофор гонии проходят несколько циклов митотических делений с неполным цитокинезом, образуя комплекс, который состоит приблизительно из ста взаимосвязанных клеток, одна из которых становится ооцитом (рис. 1-20). Как полагают, наиболее близкие к ооциту питающие клетки синтезируют желток и формируют центральную эндоплазму ооцита, тогда как находящиеся на периферии комплекса клетки участвуют в формировании эктоплазмы --- поверхностного слоя ооцита.

**Полигеномный тип оогенеза на примере Дрозофилы.** У многих насекомых в составе аналогичного синцития или *цисты* различают ооцит и *вспомогательные клетки* --- цистоциты. В литературе сохранилось историческое название этих вспомогательных клеток --- «*питающие*» клетки или «*трофоциты*» (от греч. трофоζ --- кормящий, питающий), которое отражает прежнее представление о главной функции этих клеток. Взаимоотношения между цистоцитами и ооцитом у разных видов насекомых варьируют. В *политрофных* трубочках ооцит и цистоциты образуют относительно компактный комплекс. Окруженная мезодермальным фолликулярным эпителием циста представляет собой яйцевую камеру (рис. 1-21). В *телотрофных* яйцевых трубочках гонады «трофоциты» занимают проксимальную область, тогда как ооцит смещается дистально, сохраняя, однако связь со своей «питающей клеткой», поскольку цитоплазматические мостики трансформируются в удлиненные транспортные каналы (рис. 1-22). Полигеномность усиливается благодаря многократной полиплоидизации цистоцитов. Благодаря полиплоидизации в цисте Дрозофилы, состоящей из диплоидного ооцита и пятнадцати полиплоидных цистоцитов, насчитывается около 7000 диплоидных эквивалентов, работающих на один ооцит.



Основная функция цистоцитов в яичнике насекомых состоит в выработке рРНК, иРНК и многих нежелтковых белков. Из цистоцитов в ооцит поступают многочисленные митохондрии. Что касается вителлогенеза, то выработанный в жировом теле предшественник желтка --- вителлогенин транспортируется по гемолимфе и поглощается ооцитом путем пиноцитоза. У Дрозофилы при мутации гена *fs29* нарушается функция рецепции вителлогенина. Такие мутанты стерильны, так как в их ооцитах желток не накапливается, несмотря на интенсивный синтез предшественника желтка в жировом теле.

У Дрозофилы оогенез начинается с асимметричного деления стволовых половых клеток (СПК), располагающихся в концевых отделах яйцевых трубочек --- гермариях. Исследованиями последних лет выявляется сложная система генетического контроля, которая, с одной стороны, поддерживает коммитированное состояние стволовых половых клеток, а, с другой, обеспечивает их переход к дифференциации. Поскольку принципиальная схема такого контроля представляет общий интерес для понимания процессов дифференциации коммитированных стволовых клеток, остановимся на этих данных несколько подробнее.

В результате асимметричного митоза образуются дочерняя *стволовая клетка* и так называемый *цистобласт* (рис. 1-21А, 1-23). Асимметричность деления СПК обусловлена наличием особых цитоплазматических структур --- *спектросом*. Спектросомы содержат мембранные пузырьки и скелетные мембранные белки ---  $\alpha$ - и  $\beta$ -спектрин, анкирин и HTS (*HULITAI*SHAO). Во время митоза спектросома находится в контакте с тем полюсом митотического веретена, который обращен к базальной клетке терминальной нити (рис. 1-23). Спектросомы, связываясь с веретеном, определяют его ориентацию таким образом, что одна из образующихся при делении клеток остается в контакте с терминальной нитью, а другая отдалается от нее. Вместе с тем спектросомы играют роль и в локализации некоторых регуляторных молекул, например, циклина А.

Расхождение путей развития клеток, возникших в результате деления СПК, у Дрозофилы связывают с активностью генов *pumilio* (*pum*), *nanos* (*nos*) и *bag of*

*marbles (bam)*. Активность гена *pum* необходима для поддержания линии стволовых клеток. Связывающийся с РНК белок Pum служит фактором репрессии трансляции и, видимо, избирательно подавляет трансляцию некоторых РНК уже коммитированной стволовой клетки, препятствуя, таким образом, началу ее дифференциации. Переход к дифференциации коррелирует с резким уменьшением уровня Pum (рис 1-23). Ген *nos* необходим для дифференциации цистобластов. Переход от СПК к цистобласту сопровождается существенным увеличением содержания белка Nos . В процессе переключения СПК на путь дифференциации важную роль играет также ген *bam*, мутации которого закрывают путь дифференциации клеток половой линии. Значительные количества белка Bam характерно для цистобластов и цистоцитов, что существенно отличает их от стволовых клеток.

Асимметричность делений СПК зависит и от сигналов, исходящих из соматических клеток гонады. Так, уничтожение лучами лазера апикальной части терминального филамента Дрозофилы увеличивает частоту делений СПК. Как выясняется, участие клеток терминального филамента в регуляции делений СПК обусловлено активностью генов *piwi* и *fs(1)Yb (Yb)*. В отсутствие этих генов стволовые клетки не сохраняются. По-видимому, путь, связанный с геном *Yb* специфичен для женских гонад, тогда как ген *piwi* необходим для поддержания линии СПК в гонадах обоих полов.

По-видимому, важную роль в сохранении линии СПК играет и белок Dpp (гомолог BMP2/4), кодируемый геном *dpp (decapentaplegic)*. Показано, что сигнал Dpp вырабатывается соматическими клетками, окружающими СПК. Впрочем, не исключено, что Dpp может быть и паракринным фактором дифференцирующихся половых клеток или даже аутокринным фактором, вырабатываемым самими стволовыми клетками.

Хотя цистобласты и сохраняют способность к митотическим делениям, последние характеризуются неполным цитокинезом, благодаря чему между образующимися клетками сохраняются *цитоплазматические мостики*, или кольцевые каналы. У Дрозофилы в результате четырех делений цистобласта образуется циста из шестнадцати клеток (рис. 1-21 Б). При этом две клетки

цисты (*проооциты*) имеют по четыре кольцевых канала, соединяющих их с соседними клетками. Одна из этих клеток становится ооцитом, тогда как остальные 15 оогоний превращаются в полиплоидные цистоциты.

Необходимым условием развития ооцита Дрозофилы является экспрессия гена *Bicaudal-D (Bic-D)* (рис. 1-24). Мутация *Bic-D* ведет к стерильности самки, поскольку в этом случае все 16 клеток цисты развиваются как цистоциты. Локализация иРНК<sup>Bic-D</sup> в будущем ооците зависит от активности гена *egalitarian (egl)*, мутация которого также вызывает стерильность. Незадолго до вителлогенеза иРНК<sup>Bic-D</sup> транслируется и образующийся белок после фосфорилирования приобретает свойства фактора, который обеспечивает дифференциацию ооцита. В случае мутации гена *Bic-D* возникает дефектный белок Bic-D, который не способен к фосфорилированию. Вследствие этого необходимый для дифференциации фактор не образуется, и развитие ооцита не происходит.

Суммарный гаплоидный эквивалент цистоцитов составляет более 14000~С. С учетом того, что гаплоидный набор хромосом Дрозофилы содержит примерно 250 рибосомных генов, в яйцевой камере имеется около  $3,8 \times 10^6$  рибосомных генов, работающих на обеспечение одной яйцевой клетки. Благодаря этому за трое суток оогенеза в ооците запасается до 160~нг рРНК. Интересно, что синтез рРНК может быть фактором, ограничивающим скорость оогенеза у Дрозофилы. Так, в случае мутации *bobbed*, при которой происходит делеция разных участков кластера рибосомных генов, продолжительность оогенеза зависит от числа оставшихся рибосомальных генов: при наличии 1/3 нормального содержания рДНК оогенез продолжается почти в три раза дольше (206 часов вместо 75 часов). Благодаря такой задержке зрелые яйца самок *bobbed* содержат нормальное количество рРНК.

Кроме рРНК в цистоцитах под контролем материнских генов (гены материнского действия) синтезируются иРНК, которые после оплодотворения яйца обеспечивают морфогенетически значимой информацией процесс раннего эмбриогенеза. Хромосомы ооцита у Дрозофилы инактивированы. Эта инактивация, впрочем, не обязательна при полигеномном оогенезе. У

некоторых насекомых, например, у комаров, жуков и полужесткокрылых, геном ооцита активно участвует в создании пула разных типов РНК. В ооцитах жука-плавунца *Dytiscus*, долгоножки *Tipula* (Diptera), *Chrysopa* (Neuroptera) происходит амплификация генов рРНК. Амплифицированная ДНК сконцентрирована в виде небольшого тельца, которое располагается в ядре ооцита, но отсутствует в ядрах цистоцитов. У *Dytiscus* ДНК-содержащее тельце несет около  $3 \times 10^6$  амплифицированных генов рРНК.

Перемещение РНК и белков из цистоцитов в ооцит обеспечивается механизмами внутриклеточного транспорта. Полагают, что перемещению макромолекул может способствовать электрический градиент ( $1 \sim v/\text{см}$ ), который устанавливается в системе цистоциты-ооцит. На завершающих этапах оогенеза содержимое цистоцитов транспортируется в ооцит с помощью сократительных движений.

Полигеномный принцип организации оогенеза обеспечивает высокие скорости формирования яиц. Продолжительность оогенеза Дрозофилы, где на каждый ооцит приходится  $1,4 \times 10^4$  гаплоидных геномов, составляет всего 3 - 5 дней. У Сверчка, с его *паноистическим* типом оогенеза (рис. 1-25), при котором цистоциты отсутствуют, и формирование ооцита обеспечивается всего четырьмя гаплоидными эквивалентами, оогенез продолжается более трех месяцев.

**Гипертранскрипционный тип оогенеза с участием хромосом типа ламповых щеток.** Природе известен и другой путь существенной интенсификации метаболических процессов, необходимых для формирования яйцевых клеток. Этот путь характерен для Вторичноротых. Здесь не происходит превращения части половых клеток во вспомогательные. Синтез вителлогенина и в этом случае происходит вне гонады. Однако интенсивное накопление в яйце разных форм РНК обеспечивается благодаря функциональному и структурному видоизменению хромосом самого ооцита, создающего предпосылки максимальной продуктивности транскрипции. Такой тип организации оогенеза мы будем называть гипертранскрипционным.

Впервые такие видоизмененные хромосомы были описаны в 1882 году В.~Флеммингом в ооцитах тритона, а в 1892~г. они были подробно исследованы в ооцитах акулы И.~Рюккертом. Поскольку эти хромосомы имеют большое число боковых петель ДНК, которые на микроскопических препаратах выглядели в виде отростков, расположенных на центральной оси, Рюккерт назвал их «ламповыми щетками», по сходству с повседневным бытовым инструментом, «ершиком», использовавшимся в те далекие времена для очистки стекол керосиновых ламп.

Хромосомы типа ламповых щеток появляются в профазе мейоза. Они представляют собой биваленты, т.е. спаренные в области хиазм гомологичные хромосомы (рис. 1-26). Каждая хромосома бивалента состоит из двух дуплексов конденсированной ДНК. Каждый дуплекс ДНК образует многочисленные симметричные петли, образованные идентичными последовательностями. Боковые петли деконденсированной ДНК служат местами интенсивного синтеза РНК. У гомозиготных животных каждый активный локус представлен четырьмя петлями (по две на каждом гомологе). Локализация некоторых крупных петель и их форма может иметь специфический для вида характер (рис. 1-26). Число петель и единиц транскрипции хромосомы не совпадают, так как одна петля может содержать более одной единицы транскрипции. Распрямление (спрединг) хромосом по Миллеру позволило визуализировать транскрипцию с помощью электронного микроскопа. Эта методика позволила обнаружить исключительно высокую плотность расположения молекул РНК-полимеразы на ДНК петли. В хромосомах типа ламповых щеток расстояние между последовательно расположенными молекулами РНК-полимеразы составляет 100-200 нуклеотидов. Такая плотная посадка полимераз предопределяет высокую продуктивность транскрипции. Действительно, в ооците с хромосомами типа ламповых щеток, где одна молекула РНК-полимеразы приходится на  $10^2$  нуклеотидов ДНК, в 1 минуту производится 2~пг РНК. В соматических же клетках, где одна молекула РНК-полимеразы приходится примерно на  $10^4$  нуклеотидов нити ДНК, за такое же время синтезируется всего 0,015~пг РНК.

Продукты транскрипции после сплайсинга и полиаденилирования экспортируются в цитоплазму ооцита. До 80% иРНК в цитоплазме образует

комплексы с белками секвестрации, которые инактивируют иРНК. Эти запасаемые в ооците и активируемые после оплодотворения РНП-частицы были названы А.-Спириным информосомами (1966).

Синтез рРНК при гипертранскрипционном оогенезе происходит в ооците или в фолликулярных клетках. У рыб и амфибий имеет место многократная репликация ДНК рибосомных генов или *амплификация* рДНК (от англ. amplification --- увеличение). У *Xenopus* в результате амплификации количество рДНК в ооците увеличивается примерно в 1000 раз. Амплификация начинается на стадии гоний и достигает пика на стадии пахитены. Амплифицированные гены рРНК образуют многочисленные экстрахромосомные ядрышки.

Оогенез с участием ламповых щеток имеет очевидные адаптивные преимущества. Благодаря постоянному обновлению иРНК создаются предпосылки длительного поддержания жизнеспособности яйцевой клетки, находящейся в яичнике. Это позволяет при неблагоприятных условиях избегать обязательной откладки яиц сразу же после завершения оогенеза.

Своеобразный характер приобретает принцип кооперативности в оогенезе птиц и рептилий. У рептилий синтез рРНК осуществляется *грушевидными клетками* фолликулярного эпителия (рис. 1-27). На определенном этапе своего развития грушевидные клетки соединяются с ооцитом, образуя цитоплазматический мостики. Если у насекомых с полигеномным типом оогенеза функцию поставщика рРНК выполняют цистоциты, которые представляют собой видоизмененные половые клетки, то у рептилий аналогичную функцию выполняют соматические фолликулярные клетки. Если в первом случае цитоплазматические мостики, через которые транспортируется рРНК, образуются за счет неполного цитокинеза при делении гоний, то у рептилий они, по-видимому, образуются за счет слияния мембран половой и фолликулярной клеток. В каждой фолликуле ящерицы насчитывается до 10 000 грушевидных клеток.

У птиц синтез рРНК, которая поставляется в ооцит, также происходит в клетках фолликулярного эпителия. Однако транспортным средством для доставки рРНК

в ооцит здесь служит особая органелла --- *трансосома* (рис. 1-28). Фолликулярные клетки образуют длинные отростки, которые погружены в цитоплазму ооцита. Концевые отделы этих отростков, в которых накапливаются большие количества рРНК, отшнуровываются от фолликулярной клетки. После разборки мембран рРНК из трансосомы поступает в цитоплазму ооцита.

## 1.5. Сперматогенез

Направление дифференциации мужских половых клеток резко отличаются от стратегии формирования женских гамет. Дифференциация мужских гамет предполагает максимальную редукцию цитоплазматического тела и развитие двигательного аппарата. Объем спермия определяется практически размерами компактизованного ядра, несколькими митохондриями, центросомой и величиной жгутика. Следует обратить внимание на то, что развитие мужских и женских гамет, столь различающееся в отношении цитодифференциации, происходит на фоне одной и той же принципиальной схемы ядерных преобразований, в ходе которых диплоидные первичные половые клетки (ППК) превращаются в гаплоидные гаметы.

Первые описания подвижных живчиков (“зверьков”, лат. *animalculi*) в семени животных принадлежит Гаму и Левенгуку (1677). Аналогичные образования были обнаружены и в семени человека, сперматозоид которого был увековечен на известном рисунке Николаса Хартсека (1694) (рис. 1-29). Стоявший на позициях анималькулизма Хартсекер предполагал, что именно в этих подвижных клетках предначертаны в миниатюре все структуры взрослого организма, отвергая тем самым гипотезы о паразитарной природе живчиков. Сам термин сперматозоид был введен в научную литературу К. Бэрром (1817). Окончательное решение вопроса о природе сперматозоидов как мужских половых клеток принадлежит Альберту Келликеру (1817-18NB), который на нескольких десятках видов беспозвоночных доказал развитие спермиев из клеток семенников. Келликер не только продемонстрировал все переходные формы от недифференцированной ППК до высокоспециализированного спермия, но и установил видовую специфичность спермиев и даже обнаружил у некоторых видов полиморфизм спермиев. Тем не менее, явление редукции

числа хромосом в ходе сперматогенеза оставалось незамеченным вплоть до последней четверти XIX столетия, когда Ван Бенеден, исследуя развитие мужских и женских половых клеток аскариды, описал мейоз (van Beneden, 1884). Новая страница в изучении структуры и функции спермиев открылась в 50-ые годы XX столетия, когда электронная микроскопия обнаружила принципиально новые особенности тонкой организации половых клеток.

По структурной организации и способу функционирования сперматозоиды можно подразделить на несколько типов. У подавляющего большинства видов имеются *жгутиковые сперматозоиды*. Жгутиковые сперматозоиды обычно имеют три четко выраженных отдела: головку, в которой расположено ядро, среднюю часть, или шейку, и жгутик (рис. 1-30). Известны некоторые группы животных, у которых спермии не имеют жгутиков. Безжгутиковые сперматозоиды характерны для некоторых Ecdysozoa. Так, у круглых червей имеются *амебоидные* сперматозоиды (рис. 1-31). Своеобразные безжгутиковые спермии обнаружены и у многих Членистоногих, у которых спермии имеют округлую или звездчатую форму (рис. 1-32, 1-33). Они перемещаются с помощью псевдоподий или даже могут быть неподвижными.

Сперматозоиды, как правило, имеют микроскопические размеры. Спермии гидры имеют жгут, длиной до 30~мкм. У некоторых книдарий он достигает 90~мкм. Известны и гигантские спермии. Например, у *Drosophila bifurca* длина сперматозоида составляет 58~мм. Спермий в этом случае в 20 раз длиннее тела взрослой особи и в 15000 раз длиннее спермия человека.

Хроматин ядра спермия сильно конденсирован и плотно упакован. В процессе формирования сперматозоида объем его ядра резко уменьшается (например, у петуха от 110~мкм<sup>3</sup> до 2~мкм<sup>3</sup>). Конденсация хроматина обусловлена замещением гистонов, характерных для соматических клеток, переходными белками, а затем и особыми высокоосновными спермийными белками --- протаминами и иными аргинин-богатыми белками.

Жгутиковые сперматозоиды обычно имеют акросому, хотя у многих животных, таких как гидра, некоторые моллюски, костистые рыбы, акросома отсутствует.



*Акросома* представляет секреторный пузырек, который формируется при участии аппарата Гольджи, и содержит разнообразные гидролитические ферменты. У многих животных, в частности, у млекопитающих, акросомный пузырек в процессе формирования спермия приобретает вид шапочки, облегающей переднюю часть ядра (рис. 1-34). У иглокожих между акросомным пузырьком и ядром имеется субакросомное пространство, в котором локализуются молекулы глобулярного актина.

Митохондрии часто сливаются между собой и образуют крупную хондросферу. Они обычно локализуются в основании жгутика вокруг центриоли и, как полагают, генерируют энергию для движения жгутика. Иногда, например, в сперматиде насекомых, моллюсков и кольчатых червей, слившиеся митохондрии располагаются в виде «побочного ядра» сбоку от ядра. Тем не менее, в конечном счете, митохондриальное побочное ядро окружает аксонему жгутика, или располагается рядом с ним.

*Центриоль*, которая в период делений сперматогониев и сперматоцитов определяет формирование веретена, в ходе спермиогенеза преобразуется в базальное тельце жгутика. Эта трансформация центриоли *Дрозофилы* происходит при участии *центросомина*, особого белка центросомы. Мутация *mfs*, при которой синтез центросомина не происходит, вызывает нарушение спермиогенеза и, как следствие этого, стерильность самцов.

Основу жгутика составляет так называемый осевой комплекс или *аксонема*, состоящая из двух центральных одиночных микротрубочек, вокруг которых расположены девять дублетов микротрубочек. Кроме этого комплекса спермии многих видов имеют еще один внешний круг фибрилл, также состоящий из девяти элементов, и придающий жгутику необходимую жесткость. Иногда в заднем отделе спермия образуется *ундулирующая мембрана*.

До настоящего времени не разгадано явление полиморфизма спермиев: у ряда животных в семеннике развиваются спермии двух разновидностей. Например, у некоторых гастропод (*Prosobranchia*) наряду с типичными жгутиковыми, или *эупиренными* сперматозоидами, обладающими оплодотворяющей

способностью, развиваются короткие червеобразные *апиренные* формы с нарушениями гаплоидного числа хромосом. В других случаях апиренные спермии имеют два жгутика. Доля апиренных сперматозоидов постоянна для данного вида.

У ряда американских сумчатых наблюдается феномен попарного соединения зрелых спермиев, поступивших в эпидидимис. При этом лежащая над акросомой плазматическая мембрана одного сперматозоида плотно соединяется с соответствующей областью другого. Предполагается, что такое объединение улучшает подвижность спермиев, жгутики которых расположены асимметрично относительно ядра.

Число спермиев, выводимых при осеменении, огромно. Так, у опоссума оно достигает 13~млн., у кролика --- на порядок больше. У человека ежедневно может формироваться более 100~млн. спермиев. Естественно, этот интенсивный процесс требует координации процессов пролиферации стволовых клеток и включения программ сперматогенеза, контролирующих преобразование диплоидных сперматогониев в зрелые гаплоидные сперматозоиды.

Сперматогенез подразделяется на несколько фаз (рис.1-35). Первая из них --- фаза размножения, в течение которой образующиеся после деления стволовых клеток сперматогонии размножаются путем митотических делений. Число митотических циклов у разных видов варьирует от 1 до 14. Вторая фаза --- фаза коммитации, в течение которой включаются генетические программы инициации сперматогенеза. Третья фаза --- фаза созревания. Этот этап охватывает премейотический синтез ДНК и два мейотических деления. Мужские половые клетки, находящиеся в первом мейотическом цикле, называют первичными сперматоцитами (сперматоциты 1-го порядка), а во втором --- вторичными сперматоцитами (сперматоциты 2-го порядка). После второго мейотического деления образуется гаплоидная сперматиды и наступает заключительная фаза --- фаза формирования спермия. В ходе спермиогенеза происходит резкое уменьшение объема ядра за счет элиминации нуклеоплазмы и конденсация хроматина. Изменение структуры хроматина в первую очередь,

обусловлено заменой соматических гистонов специфическими спермийными. В этот период образуется жгутик и завершается формирование акросомы. Характерной особенностью сперматогенеза является неполный цитокинез в период митотических делений сперматогоний и первого мейотического деления сперматоцитов. В результате потомки одной сперматогонии образуют синцитиальную цисту. Полагают, что наличие цитоплазматических мостиков, связывающих сперматоциты, обеспечивает высокую синхронность дифференциации мужских половых клеток, входящих в состав одной цисты. Не исключено, что синцитиальная структура важна для поддержания фенотипической эквивалентности цитоплазмы сперматид, что особенно важно в отношении иРНК, синтезируемых на генах половых хромосом, т.к. многие белки, важные для спермиогенеза, контролируются генами X и Y хромосом. Так, например, описан перенос иРНК через межклеточные мостики гаплоидных сперматид мыши с помощью белка ТВ-RBP (testis-brain-RNA-binding protein), который обладает способностью связываться с 3'UTR нетранслируемой областью различных иРНК.

Индивидуализация мужских гамет осуществляется на завершающем этапе *спермиогенеза*, когда происходит сбрасывание цитоплазмы вместе со всеми органеллами --- рибосомами, эндоплазматической сетью, аппаратом Гольджи. У некоторых животных эта остаточная или *резидуальная* цитоплазма (от лат. residuum --- остаток) (рис. 1-34), отделяющаяся от головки спермия, фагоцитируется клетками фолликулярного эпителия семенника.

В опытах по так называемому *микрооплодотворению*, когда мужские половые клетки вводятся в ооцит с помощью микроинъекции или путем искусственного «сшивания» гамет, выяснилось, что уже ранние сперматиды и даже вторичные и ---иногда--- первичные сперматоциты обладают потенциальностью к образованию зиготы, способной к дальнейшему развитию. Другими словами, сложные процессы цитодифференциации, происходящие в период спермиогенеза, необходимы, прежде всего, для формирования аппарата движения, механизмов закоривания и слияния с женской гаметой.

Процесс сперматогенеза предполагает тесную корреляцию митотических и мейотических циклов со сложной программой клеточной дифференциации. О существовании относительной автономии программы мейоза свидетельствует мутация *twine*, вызывающая у Дрозофилы существенные аномалии мейоза и, вместе с тем, не затрагивающая заметным образом дифференциацию сперматид. Несмотря на нарушения сегрегации мейотических хромосом и цитокинеза, в семенниках мутантных самцов наблюдаются половые клетки, у которых происходит конденсация хроматина, характерное видоизменение формы ядра и образование жгутика. Наряду с этим известны мутации, которые блокируют одновременно и мейоз, и спермиогенез. Эти мутации свидетельствуют о том, что на определенной стадии сперматогенеза действует сопряженная программа развития, в равной степени необходимая как для мейотического цикла, так и для дифференциации сперматид.

Семенник позвоночных подразделен на два отдела: семенные каналцы и межканальцевое пространство, или соединительно-тканную строму. В последней находится обширная сеть кровеносных сосудов, интерстициальные клетки или клетки Лейдига, а также макрофаги, фибробласты, лимфоциты и тучные клетки. Семенные каналцы отделены от стромы так называемой ограничивающей мембраной, которая образована уплощенными клетками, расположенными в 2-3 слоя. Полагают, что эти клетки могут превращаться в клетки Лейдига. Эпителий семенных каналцев имеет сложный состав и образован клетками двух типов: половыми (гоноцитами) и соматическими клетками фолликулярного эпителия. Последние часто называют клетками Сертоли, или опорными клетками. Реже их называют sustentоцитами (от лат. *sustentans* --- поддерживающий). Между половыми и опорными клетками в течение всего сперматогенеза (у крысы цикл сперматогенеза длится 42 дня, у человека --- 74 дня) сохраняется постоянная взаимосвязь. Клетки Сертоли многофункциональны. Они обеспечивают дифференцирующиеся мужские половые клетки питанием и способствуют созданию необходимой для нормального сперматогенеза концентрации андрогенов. Опорные клетки играют также важную роль в перемещении половых клеток из базального отсека каналца в околополостной. Они участвуют в создании гематотестикулярного барьера, который предохраняет половые клетки от разного рода метаболитов и

токсинов, а также предотвращает аутоиммунизацию организма против собственных спермиев. Благодаря строго скоординированной сборке и разборке плотных контактов между клетками Сертоли происходит своего рода «шлюзование» сперматоцитов в околополостной компармент канальца с сохранением непроницаемой границы между отсеками (рис 1-36).

Функциональная активность семенника у позвоночных во многом обусловлена гормональной регуляцией со стороны гипоталамо-гипофизарной системы. Инициация сперматогенеза обусловлена секрецией лютеинизирующего гормона (ЛГ) и фолликулстимулирующего гормона (ФСГ) (рис. 1-37), которые вырабатываются в передней доле гипофиза. Мишенями ФСГ являются в канальцах --- клетки Сертоли, а в строме --- макрофаги. Действие ЛГ на сперматогенез опосредовано клетками Лейдига: под действием ЛГ в этих клетках активируется синтез мужского полового гормона тестостерона, наличие которого является непременным условием сперматогенеза. В обоих случаях происходит выработка паракринных, (т.е. действующих вблизи от места секреции) факторов, поддерживающих активность клеток Лейдига. ФСГ стимулирует также аккумуляцию тестостерона в клетках Сертоли, создавая предпосылку нормального сперматогенеза. Дифференциация клеток Сертоли у мыши по времени совпадает с экспрессией гена *Tsx*, что дает основание предполагать участие этого гена в осуществлении специфической функции клеток Сертоли --- обеспечении сперматогенного цикла у животных, достигших половой зрелости. Для поддержания этой же функции необходимы и белки, продуцируемые клетками Лейдига. Показано, что эти белки (Gas 6, S) служат лигандами, которые воспринимаются специфическими тирозинкиназными рецепторами клеток Сертоли.

Поступающие извне сигналы инициируют активность генетических программ сперматогенеза. Методом иммуноблотинга было показано, что у мыши в период сперматогенеза в результате экспрессии генов в половых клетках появляется целый ряд специфических для этого периода антигенов (рис. 1-38). Глобальная транскрипция прекращается за несколько дней до завершения спермиогенеза. В период спермиогенеза активируется трансляция ранее синтезированных иРНК. В частности, активируется трансляция транскриптов протамина. Благодаря

динамической модификации хроматина и точной координации процессов транскрипции и процессинга иРНК достигается экспрессия белков, специфических для разных этапов спермиогенеза.

Решающую роль в активации генов, ответственных за спермиогенез и экспрессирующихся в гаплоидном геноме, играет цАМФ-зависимый транскрипционный фактор CREM. Оказалось, что необходимым элементом для экспрессии генов в период спермиогенеза является активация аденилатциклазной системы мужских половых клеток. Было показано, что гонадотропные гормоны гипофиза, взаимодействуя с рецепторами мембран, активируют G-белок и связанную с ним аденилатциклазу. Это, в конечном счете, индуцирует накопление цАМФ в клетках Сертоли, воспринимающих сигнал ФСГ, и в клетках Лейдига, взаимодействующих с ЛГ. Повышение уровня цАМФ вызывает диссоциацию неактивного комплекса протеинкиназы А на две субъединицы --- регуляторную и каталитическую. После диссоциации каталитическая субъединица фосфорилирует ядерные транскрипционные факторы класса bZIP, которые связываются со специфической нуклеотидной последовательностью TGACGTCA в промоторах генов-мишеней. Этот сайт называют CRE (от *cAMP responsive element*). Соответственно, транскрипционные факторы, связывающиеся с CRE, называются CREB (*CRE binding protein*) и CREM (*CRE modulator*). Оказалось, что эти факторы играют важную роль в спермиогенезе. У мышей половое созревание сопровождается появлением больших количеств фактора CREM. Ген *crem* экспрессируется в сперматоцитах, начиная со стадии пахитены. Синтез же соответствующего белка происходит только на стадии ранней сперматиды. У сперматозоидов белок CREM отсутствует. Наблюдения на нокаутированных мышах *crem*<sup>-/-</sup> показали, что такие мыши не имеют видимых отклонений от нормы за исключением изменения семенников, вес которых на 20 --- 25% меньше веса семенников нормальных мышей. Гомозиготные *crem*<sup>-/-</sup> самцы в отличие от самок оказались стерильными: в семенной жидкости сперматозоиды отсутствовали. При микроскопическом исследовании семенных канальцев оказалось, что сперматогенез у мышей, лишенных гена *crem*, не шел дальше стадии ранней сперматиды. Спермиогенез был полностью подавлен, хотя клетки Сертоли имели нормальный вид.

У Дрозофилы во время спермиогенеза экспрессируется специфический для мужских половых клеток ген *don juan*. Начало синтеза белка Don Juan приходится на стадию удлинённой сперматиды и продолжается в течение всего спермиогенеза. Этот белок имеет молекулярный вес 29~кДа и характеризуется высоким содержанием лизина. Как полагают, белок Don Juan участвует в дифференциации митохондрий и обеспечивает морфогенез жгутика спермия.

Важным моментом дифференциации сперматид является экспрессия специфических для сперматозоидов трансмембранных белков, которые обеспечивают адгезию мужской гаметы и ооцита. У млекопитающих эту функцию выполняют  $\beta$ -1,4-галактозилтрансфераза, зонадгезин и фертилин. Последний принадлежит семейству белков ADAM (*a disintegrin and metalloprotease*), одна из функций которых состоит в процессинге рецепторов плазматической мембраны.

#### ЛИТЕРАТУРА

Айзенштат Т. Б. Цитология оогенеза. Изд. Наука. Москва. 1984. 247 стр.

Албертс Б., Брей Д., Льюис Дж., Рэфф М., и др. Молекулярная биология клетки. Изд. Мир. Москва. 1987. Глава 14. Половые клетки и оплодотворение. Стр. 7 - 51.

Иванова-Казас О. М. Эволюционная эмбриология животных. Глава 2. Половые клетки и оплодотворение Изд. Наука, Санкт-Петербург. 1995. Стр. 19 - 31.

Рузен-Ранге Э. Сперматогенез у животных. Мир. Москва. 1980. 255 стр.

Современные проблемы сперматогенеза. Изд. Наука. Москва. 1982. 259 стр.

Сперматогенез и его регуляция. Изд. Наука. Москва. 1983. 232 стр.

Extavour C.G., Akam M. Mechanisms of germ cell specification across the metazoans: epigenesis and preformation/Development. 130. pp 5869-5884 (2003)

## ГЛАВА 2. ОПЛОДОТВОРЕНИЕ

Оплодотворение, исходный момент возникновения новой генетической индивидуальности, представляет собой процесс соединения женской и мужской гамет. В результате оплодотворения возникает одноклеточный зародыш с диплоидным набором хромосом, и активируется цепь событий, лежащих в основе развития организма.

Биологическое значение оплодотворения огромно: будучи предпосылкой развития новой индивидуальности, оно вместе с тем является условием продолжения жизни и эволюции вида.

Следует подчеркнуть, что оплодотворение представляет собой не одномоментный акт, но именно процесс, занимающий более или менее продолжительный отрезок времени. Это --- многоступенчатый процесс, в котором различаются следующие этапы: *привлечение* сперматозоида яйцом, *связывание* гамет, и, наконец, *слияние* мужских и женских половых клеток (рис. 2-1). В научной литературе события, связанные со сближением гамет иногда называют *осеменением*, различая наружное и внутреннее осеменение, в зависимости от того, выводятся ли мужские половые клетки, соответственно, в окружающую среду или в половые органы женской особи. Наружное осеменение характерно для животных, обитающих в водной среде. Внутреннее осеменение присуще, главным образом, наземным животным, хотя оно достаточно часто встречается и у обитателей водной среды. Осеменение может быть свободным, при котором все области ооцита доступны спермиям, но может быть и ограниченным, когда на поверхности яйцеклетки имеется плотная оболочка с микропиле (рис. 2-2). При внутреннем осеменении у ряда животных мужские гаметы передаются самкам в виде *сперматофоров* (от греч. σπέρμα -- семя; φορός --- несущий), особых капсул, содержащих сперматозоиды. Сперматофоры сначала выводятся в окружающую среду, а затем тем или иным способом переносятся в половые пути самки.

Соединение гамет предопределяет возможность *кариогамии* (от греч. κάριον --- орех, ядро; γάμος --- брак), или слияния ядер. Благодаря кариогамии происходит объединение отцовских и материнских хромосом, ведущее к образованию



генома новой особи. В результате слияния гамет возникает диплоидная *зигота*, восстанавливается способность к репликации ДНК и начинается подготовка к делениям дробления. Механизмы активации яйца к развитию относительно автономны. Их включение может быть осуществлено и помимо оплодотворения, что происходит, например, при естественном или искусственном девственном развитии или *партеногенезе* (от греч. παρθενοῦς --- девственный).

Интерес к проблеме оплодотворения выходит далеко за рамки собственно эмбриологии. Слияние гамет --- плодотворная модель для изучения тонких молекулярных и клеточных механизмов специфического взаимодействия клеточных мембран; для изучения молекулярных основ активации метаболизма и пролиферации соматических клеток. Общебиологический интерес представляет и то, что оплодотворение являет собой яркий и, может быть, уникальный пример полного обращения клеточной дифференциации. Действительно, высокоспециализированные половые клетки не способны к самовоспроизведению. Они гаплоидны и не способны делиться. Однако, после слияния, они превращаются в тотипотентную клетку, которая служит источником формирования всех клеточных типов, присущих данному организму.

История открытия оплодотворения теряется в глубине веков. Во всяком случае, в 18-ом столетии итальянский естествоиспытатель аббат Л. Спалланцани (1729 --- 1799) экспериментально доказал, что оплодотворение зависит от наличия спермы, и впервые осуществил искусственное оплодотворение яиц лягушки, смешивая их со спермой, полученной из семенников. Тем не менее, смысл происходящих при этом событий оставался неясным практически до последней четверти 19-го века, когда Оскар Гертвиг (1849 --- 1922) в конце 1870-х годов, изучая оплодотворение у морских ежей, пришел к заключению, что сущность этого процесса состоит в слиянии ядер половых клеток. Вместе с работами швейцарского зоолога Германа Фоля (1887, морская звезда), бельгийца Эдуарда ван Бенедена (1883, аскарида) и немецкого ученого Теодора Бовери (1887, аскарида) исследования О. Гертвига заложили основу современных представлений об оплодотворении. Следует подчеркнуть, что именно эти работы послужили веским основанием для предположения о том, что ядро

является носителем наследственных свойств. Именно Т. Бовери (1862 --- 1915) в серии блестящих цитологических исследований обосновал в 1887 --- 88 гг. теорию индивидуальности хромосом и создал основу цитогенетики.

Вскоре после выяснения сущности оплодотворения внимание исследователей сосредоточилось на механизмах, лежащих в основе этого процесса. Эта область исследований сохраняет свою актуальность и в наше время. Пальма первенства в построении первой теории оплодотворения принадлежит американскому исследователю Франку Лилли (1862 --- 1915). Изучая свойства «яичной воды», т.е. морской воды, в которой некоторое время находились неоплодотворенные яйца морского ежа *Arbacia* или полихеты *Nereis*, Лилли обнаружил, что из яиц выделяется вещество, которое обладает способностью склеивать спермии в комки. Наблюдаемая агглютинация оказалась видоспецифичной, и Лилли назвал фактор агглютинации, выделяемый неоплодотворенным яйцом, веществом оплодотворения или фертилизином (от англ. fertilization --- оплодотворение). Суть выдвинутой Лилли теории оплодотворения состоит в признании того, что в периферической области яйца находится фертилизин, который имеет сродство к поверхностным рецепторам спермия (антифертилизин спермия). Благодаря этому сродству фертилизин связывает, согласно Лилли, спермии (рис. 2-3). Однако, претендуя на универсальность и объяснение не только самого соединения гамет, но и явления агглютинации спермиев, предотвращения полиспермии, высокую специфичность реакции и т.д., теория фертилизина нуждалась в многочисленных дополнительных допущениях, под гнетом которых она, в конце концов, и угасла.

В ходе этих ранних исследований оплодотворения возникло представление о *гамонах* --- веществах, которые обеспечивают активацию или блокирование отдельных этапов оплодотворения. В соответствии с их происхождением различали *гиногамоны*, выделяемые яйцеклетками, и *андрогамоны*, вырабатываемые мужскими половыми клетками. Так, полагали, что гиногамон 1, диффундируя из яйца, активирует движение сперматозоида, преодолевая действие андрогамона 1, который ингибирует движение сперматозоида. Гиногамон 2 --- синоним фертилизина, а андрогамон 2 --- антифертилизина спермия.

В пятидесятые годы прошлого столетия идея о взаимодействии фертилизина с антифертилизином трансформировалась в гипотезу специфического фагоцитоза. Согласно этой концепции, существование на поверхности яйца и спермия взаимодействующих рецепторов и антирецепторов обеспечивает комплементарную реакцию застезки «молнии», благодаря которой спермий оказывается поглощенным яйцом.

Несмотря на известную умозрительность, эти и многие другие подобные гипотезы о механизмах взаимодействия сперматозоидов и яиц сыграли свою положительную роль, обнаружив, во-первых, реальность существования целого семейства специфических молекул на поверхности взаимодействующих гамет, и, во-вторых, положив начало планомерным исследованиям природы этих молекул.

Вторая половина 20-го столетия --- период расцвета ультраструктурных и молекулярно-биологических исследований, которые выявили большое разнообразие конкретных форм клеточного взаимодействия при оплодотворении. Стало ясно, что универсальная теория оплодотворения, если и может существовать, то только как свод некоторых самых общих принципов организации этого процесса.

Конкретные механизмы оплодотворения зависят от множества факторов. Достаточно сказать о своеобразии оплодотворения у животных с наружным или внутренним осеменением. Очевидно, что определенные различия процесса оплодотворения обусловлены и тем, что у разных животных проникновение спермия в яйцо происходит на разных этапах оогенеза. У многих аннелид, моллюсков, нематод и ракообразных сперматозоид проникает в ооциты первого порядка на стадии *профазы*. У других кольчатых червей, моллюсков и у насекомых --- на стадии *метафазы* первичного ооцита. Для многих позвоночных характерно осеменение на стадии метафазы вторичного ооцита. У некоторых кишечнополостных или у морских ежей оплодотворение происходит на стадии зрелого яйца уже после завершения делений созревания и выделения *направительных телец*. Наконец, нельзя не вспомнить и разнообразие типов сперматозоидов, среди которых имеются жгутиковые формы и спермии без жгутиков (например, амебоидные спермии нематод), с акросомой и без нее, имеющие акросомную нить и лишенные ее. Естественно, что в каждом таком

случае конкретные механизмы, обеспечивающие тонкое взаимодействие между половыми клетками, различаются.

**Активация движения спермиев.** Сперматозоиды, энергетический ресурс которых ничтожен, и активная жизнь которых в лучшем случае продолжается считанные часы, находятся в семенниках и семенной жидкости в неподвижном состоянии. Процесс активации сперматозоидов широко распространен в животном мире и у разных животных, изученных в этом отношении, обнаруживаются различные механизмы.

Во многих случаях активность движения сперматозоидов обусловлена сигналами, идущими из внешней среды. Среди этих сигналов --- разнообразные физические и химические факторы: такие как изменение соотношения  $O_2/CO_2$ , рН, концентрации тяжелых металлов и др.

У лососевых рыб спермии неподвижны в среде с высокой концентрацией  $K^+$ , характерной для семенной жидкости. В среде, с низкой концентрацией  $K^+$ , спермии приобретают подвижность, что, видимо, связано с выходом  $K^+$  через соответствующие каналы плазматической мембраны. Действительно, блокаторы  $K^+$  каналов, подавляющие выход  $K^+$ , предотвращают и начало движения спермиев. При выходе  $K^+$  изменяется заряд плазматической мембраны спермия и повышается концентрация внутриклеточного  $Ca^{2+}$ , который высвобождается из внутренних депо или поступает извне. При этом происходит активация аденилициклазы и усиливается синтез циклического АМФ, который активирует протеинкиназу А. Активность этого фермента является предпосылкой активации тирозинкиназы. Последняя обеспечивает фосфорилирование тирозиновых остатков особого фосфопротеина (MIPP, *motility initiating phosphoprotein*), локализованного в основании жгутика спермия, по-видимому, в его центриольной области и инициирующего его движение.

Сперматозоиды костистых рыб и некоторых других животных находятся в состоянии покоя, если осмолярность среды изотонична семенной жидкости (у рыб --- около 300 мОсм/кг). У пресноводных костистых рыб и амфибий спермии приобретают подвижность при разбавлении семенной жидкости гипотоническим раствором, тогда как у морских костистых рыб тот же эффект

достигается гипертоническим раствором. Другими словами, подвижность спермиев у рыб обусловлена не абсолютным значением осмолярности, а ее соответствием условиям среды, в которой происходит естественный *нерест* животного (рис.2-4).

**Привлечение спермиев.** Регуляция активности и направления движения сперматозоидов обусловлена некими сигналами, которые обеспечивают общение между гаметами на расстоянии. Различают *хемокинез* --- процессы, регулирующие активность движения спермиев и *хемотаксис* --- процессы, регулирующие направление движения спермия.

У многих морских животных с наружным осеменением (например, у кишечнополостных, моллюсков, иглокожих, первичнохордовых) описаны привлекающие спермии вещества, или *аттрактанты* (от лат. *tractio* --- притяжение), которые выделяются яйцом во внешнюю среду. Природа этих видоспецифических аттрактантов изучена слабо. Иногда выделение такого рода гамонов приурочено к определенной стадии оогенеза. Например, у некоторых кишечнополостных яйцо приобретает способность привлекать сперматозоиды только по завершении второго мейотического деления.

У морских ежей из студенистой оболочки яйца выделены небольшие пептиды, насчитывающие 10 --- 14 аминокислотных остатков, которые видоспецифически стимулируют и метаболизм сперматозоидов, и их подвижность. Наиболее подробно исследованы *сперакт*, пептид, полученный из яиц *Strongylocentrotus purpuratus*, и *резакт*, выделенный из яиц *Arbacia punctulata* (рис. 2-5). Сходные пептиды (SAP, sperm activating peptides) обнаружены у представителей всех отрядов морских ежей. Все они имеют видовую специфику и не могут перекрестно активировать спермии другого вида. Диффундируя в морскую воду, эти пептиды оказывают не только активирующее, но и положительное хемотаксическое действие на сперматозоиды своего вида. При этом, например, скорость движения сперматозоида в градиенте резакта возрастает до 130~мкм/сек.

Указанные пептиды взаимодействуют со специфическими рецепторами плазматической мембраны сперматозоида. Рецепторы сперакта и резакта представляют собой кислые гликопротеины с молекулярным весом

соответственно 77~кДа и 160~кДа. Эти рецепторы либо связаны с гуанилилциклазой (как это имеет место в случае рецептора сперакта), либо сами обладают гуанилилциклазной активностью (рецептор резакта). Уже через 3 секунды после взаимодействия мембраны с сигнальным пептидом гуанилатциклаза дефосфорилируется и приходит в активное состояние. В результате этого в клетке накапливается цГМФ, активируются протеинкиназы, индуцируется приток  $\text{Na}^+$  и отток  $\text{H}^+$  из спермия. В конечном счете, эти изменения приводят к увеличению внутриклеточного рН, стимуляции скорости дыхания и усиленной активности жгутика

**Первичное связывание спермия** с поверхностью яйца обусловлено двумя механизмами. У ряда животных взаимодействие половых клеток обусловлено специальными молекулами, которые встроены в плазматические мембраны гамет. У других --- соответствующие молекулы появляются на поверхности спермия в результате акросомной реакции. Например, первичное связывание половых клеток у нематоды *C.elegans* обусловлено интегральным белком плазматической оболочки леммы спермия --- SPE-9, который в качестве лиганда (от лат. *ligo* --- связывать) взаимодействует с соответствующим рецептором ооцита (рис. 2-6). У млекопитающих первичное связывание с яйцом происходит только после изменения структуры плазматической мембраны и надмембранного комплекса. Сперматозоид, взятый из эпидидимиса, который уже способен к активному движению, тем не менее, не может закрепиться на поверхности яйцевой клетки. Эту способность спермии приобретают в половых путях самки, где под воздействием среды происходит преобразование мембраны сперматозоида --- так называемая *капаситации* (от англ. *capacitancy* --- способность). В ходе капаситации, как полагают, происходит изменение липидного состава плазматической мембраны спермия, ведущее к ее дестабилизации в области акросомного пузырька. Важным элементом капаситации являются удаление своеобразного покрова с поверхности спермия и разблокировка молекул адгезии, которые обеспечивают первичное соединение спермия с яйцеклеткой. У млекопитающих молекулы адгезии сперматозоида представлены, в частности, ферментом галактозилтрансферазой. Галактозилтрансфераза принадлежит к обширному семейству гликозилтрансфераз, участвующих обычно в синтезе полисахаридных цепей

разных гликоконъюгатов, включая гликопротеины, гликолипиды и др. Функция гликозилтрансфераз состоит в переносе сахарного остатка с молекулы донора на акцептор. В отсутствие акцептора гликозилтрансферазы образуют инактивированный комплекс с молекулой-донором. Галактозилтрансфераза (ГалТаза) обнаруживается уже на стадии первичных половых клеток, где она, как молекула клеточной адгезии, видимо обеспечивает миграцию первичных половых клеток в зачатки гонад. На ранних этапах сперматогенеза ГалТаза равномерно распределена по поверхности сперматоцитов, но при формировании сперматид она концентрируется в той области клетки, которая дает переднюю половину головки спермия. В эпидидимисе ГалТаза спермия инактивируется благодаря взаимодействию с галактозамингликаном --- N-ацетилгалактозамином, молекулы которого плотно прикрывают активные участки галактозилтрансферазы. В ходе капаситации эти полимерные молекулы удаляются с поверхности сперматозоида, в результате чего молекулы плазматической мембраны последнего приобретают способность к взаимодействию с поверхностью яйца (рис.2-7).

Значение галактозилтрансферазы для оплодотворения у млекопитающих ярко проявляется у мышей, имеющих мутации комплекса T/t. Этот комплекс, расположенный в проксимальной области 17-ой хромосомы, состоит из большого числа аллелей --- доминантных (T) и рецессивных (t). При мутациях комплекса T/t обнаруживаются различного рода нарушения сперматогенеза, оплодотворения и раннего эмбриогенеза. Сперматозоиды, имеющие мутантные аллели, отличаются большей оплодотворяющей способностью по сравнению с нормальными спермиями. Если при скрещивании самцов дикого типа (+/+) и мутантных самок (t12/+) соотношение потомков с генотипами (+/+) и (t12/+) составляет 1:1, то среди потомков самцов (t12/+) и самок (+/+) 95% имеют мутантную аллель (t12/+). Очевидно, что спермии «t12» при оплодотворении имеют явные преимущества перед спермиями «+». Поскольку спермии «t12» отличаются необычно высоким уровнем содержания галактозилтрансферазы в плазматической мембране, логично предположить существование корреляции между оплодотворяющей способностью сперматозоида и активностью его галактозилтрансферазы.

Возможно, что капаситация имеет более широкое распространение, чем это представляется в настоящее время. Выяснилось, например, что, как и у млекопитающих, спермии креветки *Sicyonia ingentis* перед тем, как они приобретут способность к оплодотворению, также претерпевают некоторые преобразования, находясь в семеприемниках самки. Оплодотворяющую способность спермии гидроидного полипа *Obelia* приобретают лишь после прохождения через крышечку гонангия. Сравнительно-эмбриологическим исследованиям молекулярных механизмов капаситации спермиев животных еще предстоит развернуться.

**Акрсомная реакция.** Как уже было отмечено, у многих животных первичное связывание половых клеток осуществляется в ходе так называемой *акрсомной реакции*. Акрсомная реакция в деталях существенно различается у разных видов животных в зависимости от структурных и функциональных особенностей сперматозоидов. Сущность этой реакции, однако, неизменна: она состоит в секреции содержимого акрсомного пузырька. В результате происходящего экзоцитоза гидролитические ферменты, находящиеся в акрсомном пузырьке, попадают на поверхность яйца и разрушают оболочки яйца, прикрывающие его плазматическую мембрану.

Известны, по крайней мере, два типа акрсомной реакции. В одном случае акрсомная реакция служит необходимым *условием* связывания гамет. Так, например, у Иголокожих в результате экзоцитоза акрсомного пузырька на поверхности спермия открываются молекулы, которые обеспечивают его закрепление на яйцеклетке. Возможны, однако, и обратные отношения, когда акрсомная реакция становится возможной лишь *после закрепления сперматозоида* на поверхности яйца. Этот тип взаимодействий характерен для млекопитающих.

**Акрсомная реакция у морских ежей.** Триггером акрсомной реакции спермиев иглокожих служат некоторые компоненты студенистой оболочки яйца. Так, у морской звезды *Asterina pectinifera* в студенистой оболочке выявлен сульфатированный гликопротеин (ARIS, *acrosome reaction inducible substance*), который при наличии особого кофактора видоспецифически индуцирует акрсомную реакцию. У морских ежей аналогичную функцию выполняют



гликопротеины 82~кДа и 138~кДа. Восприятие этих сигналов обеспечивается соответствующими рецепторами мембраны спермия, гликопротеином, который, возможно, является  $\text{Ca}^{2+}$ -каналом или же эффектором поступления внешнего  $\text{Ca}^{2+}$ .

В результате активации указанных рецепторов увеличивается концентрация  $\text{Ca}^{2+}$  в цитозоле клетки, усиливается выход  $\text{H}^+$  и происходит рост pH внутри сперматозоида. Как известно, повышение концентрации ионов кальция в клетке обычно является предпосылкой различного рода секреторных процессов, будь то секреция инсулина в клетках поджелудочной железы или выделение нейротрансмиттеров в синаптических окончаниях. У сперматозоида повышение концентрации внутриклеточного кальция сверх определенного порога служит пусковым сигналом экзоцитоза содержимого акросомного пузырька, в ходе которого мембрана пузырька сливается с плазматической мембраной сперматозоида. Благодаря этому содержимое пузырька секретруется во внешнюю среду, а различные гидролитические ферменты, находившиеся в акросомном пузырьке, приходят в контакт со студенистой и желточной оболочкой яйца и начинают их разрушать (рис.2-8).

Рост pH внутри клетки, обусловленный выведением  $\text{H}^+$  и поступлением  $\text{Na}^+$ , вызывает, по крайней мере, два важных события. Во-первых, происходит полимеризация актина, сосредоточенного в спермиях морского ежа в виде мономеров в субакросомальной области. Благодаря этому возникает акросомная нить, образованная актиновыми микрофиламентами и мембраной акросомного пузырька. Во-вторых, защелачивание внутренней среды спермия способствует активации АТФазы и тем самым --- интенсификации движения жгута сперматозоида (рис. 2-9).

В результате экзоцитоза акросомного пузырька и формирования акросомной нити на ее поверхности оказывается один из главных компонентов мембраны акросомной гранулы --- *биндин*, ( от англ. to bind --- связывать) (рис. 2-10). Первоначально биндин транслируется как крупная молекула, насчитывающая более 480 аминокислотных остатков. Однако примерно половина этой молекулы играет вспомогательную роль при транспортировке и упаковке биндина в акросомной грануле на завершающих стадиях сперматогенеза. Зрелый биндин у разных видов морских ежей имеет в своем составе всего 220 --

- 240 аминокислотных остатков. Оказалось, что в составе биндинов, выделенных из спермиев представителей разных групп морских ежей (Clypeasteroidea, Arbaciidae, Strongylocentrotiidae), которые в ходе эволюции разошлись около 200~млн. лет тому назад, имеется консервативная последовательность примерно из 60 аминокислотных остатков. Эта консервативная центральная область фланкирована более изменчивыми аминотерминальной и карбокситерминальной областями. Замечательной особенностью этих участков является то, что они содержат повторяющиеся элементы, благодаря которым биндин приобретает свойства белкового клея, придающие ему дополнительные адгезивные свойства. Изолированный биндин видоспецифически агглютинирует яйца, что указывает на наличие на поверхности яиц особых рецепторов биндина. Рецептором биндина у морских ежей служит комплекс из четырех одинаковых гликопротеиновых субъединиц. Каждая субъединица 350~кДа имеет короткую карбокситерминальную цитоплазматическую область, трансмембранную область, и, наконец, внеклеточный взаимодействующий с биндином домен, часть которого имеет структурное сходство с белком теплового шока Hsp 70. Во внеклеточном домене выявлена зона с высоким содержанием цистеина. Как полагают, именно здесь образуются дисульфидные мостики, соединяющие субъединицы в гомотетрамер --- функционально активный рецептор биндина. Яйцо морского ежа содержит около  $1,25 \times 10^6$  молекул рецептора. Молекулы рецептора биндина на поверхности яйца распределены неравномерно, что в известной степени предопределяет возможную область проникновения сперматозоида в яйцо. Предполагается, что помимо связывания сперматозоида с яйцом биндин участвует и в процессе слияния мембран взаимодействующих гамет.

**Акрсомная реакция у млекопитающих.** У млекопитающих акросомной реакции предшествует закоривание спермия на оболочке яйца. Акрсомная нить у них не образуется (рис.2-11). Аналогом желточной оболочки у млекопитающих служит *zona pellucida*, которая представляет собой своего рода внеклеточный матрикс, образующийся вокруг ооцита в период роста последнего. При оплодотворении *zona pellucida* выполняет несколько важных функций, в том числе она обеспечивает узнавание яйца спермием, первичное связывание спермия, запуск акросомной реакции и, наконец, блокировку полиспермии. *Zona pellucida* образована гликопротеинами, число

разновидностей которых у разных видов млекопитающих колеблется от 2 до 4. У мыши выделены три гликопротеина --- ZP1, ZP2 и ZP3. ZP2 и ZP3 образуют гетеродимеры, которые соединяются в виде цепочек. ZP1 образуют гомодимеры, которые служат поперечными связками этих цепочек. Главным функциональным компонентом является гликопротеин ZP3 (83~кДа), который кроме структурной выполняет еще, по крайней мере, две функции, обеспечивая первичное связывание сперматозоида и индуцируя акросомную реакцию. Карбокситерминальная область белка ZP3 сильно гликозилирована. Эта углеводная часть молекулы играет главную роль в связывании сперматозоида. Что касается акросомной реакции, то она определяется и углеводной и белковой частями этого гликопротеина.

Первичное связывание гамет у мыши обеспечивается, по меньшей мере, тремя разными белками плазматической мембраны сперматозоида, взаимодействующими с гликопротеином ZP3. Во-первых, это упоминавшаяся уже галактозилтрансфераза мембраны спермия, которая взаимодействует с терминальной N-ацетилглюкозаминной группой олигосахарида, входящего в состав ZP3. Во-вторых, у сперматозоида имеется особый рецептор, взаимодействующий с остатком галактозы ZP3 и, наконец, на поверхности мужской гаметы обнаружена протеаза, которая специфически взаимодействует с определенным участком гликопротеина ZP3. После оплодотворения ZP3 под действием гликозидаз кортикальных гранул ооцита модифицируется и утрачивает свою биологическую активность. Гомологи ZP3 выявлены у других млекопитающих и человека. По-видимому, у разных видов млекопитающих имеется своя специфика молекулярных механизмов первичного (до акросомной реакции) и вторичного (после нее) связывания сперматозоида на поверхности оболочки яйца. У мыши во вторичном заякоривании участвует белок ZP2. У спермиев свиньи оно опосредуется содержащимися в акросоме *проакрозином*, предшественником протеолитического фермента *акрозина*. Проакрозин в качестве молекулы адгезии функционирует как белок, способный к связыванию фукозы *zona pellucida*. Особые белки связывания обнаружены и у морской свинки.

Условием начала акросомной реакции у сперматозоидов мыши, по-видимому, является его взаимодействие с олигосахаридами молекулы ZP3.

Предполагается, что начало акросомной реакции обусловлено агрегацией соответствующих рецепторов (белок 95~кДа и другие) в плоскости плазматической мембраны спермия. Эта агрегация каким-то образом стимулирует активность встроенной в мембрану тирозинкиназы, и инициирует таким образом цепь процессов, ведущих к акросомному экзоцитозу.

Закрепление сперматозоида на яйцевой оболочке создает условия, обеспечивающие высокую локальную концентрацию протеолитических ферментов, излившихся из акросомного пузырька. Важную роль в разрушении *zona pellucida* играет, например,  $\beta$ -N-ацетилглюкозаминидаза, которая высвобождается при акросомной реакции и облегчает прохождение спермия сквозь яйцевую оболочку.

У моллюска *Haliotis rufescens* (морское ушко) в ходе акросомной реакции выделяется белок *лизин* (16 кДа), который образует отверстие в желточной оболочке яйца на основе неферментативного стоихиметрического механизма. Действие лизина в высшей степени видоспецифично.

Так или иначе, в результате акросомной реакции оболочка яйца подвергается энергичному разрушению. Прохождению сперматозоида сквозь оболочки яйца способствует и усиление двигательной активности жгута. Все это приводит к установлению тесного контакта между плазматическими мембранами мужской и женской гамет.

Ключевым элементом механизма активации акросомной реакции сперматозоидов животных служат гуаниннуклеотид-связывающие белки, или G-белки. Эти белки плазматической мембраны играют роль посредника между рецепторами мембраны и разнообразными белками --- эффекторами клетки. G-белки стимулируют или ингибируют эффекторные белки, интегрируя сигналы от разного рода рецепторов, усиливая сигналы рецептора и т.п.

Участие G-белков в процессах активации гамет, по-видимому, является одним из древнейших свойств эукариот. Известно, например, что у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* в половом процессе участвуют клетки  $\alpha$ - и  $\beta$ -типов спаривания, которые вырабатывают особые факторы спаривания --- *феромоны*. Показано, что феромоны одного партнера активируют G-белки другого

партнера, запуская, таким образом, целый ряд процессов, необходимых для спаривания клеток: блокируются клеточные деления, высвобождаются ионы кальция, изменяется активность транскрипции генов. В частности, начинается экспрессия генов молекул адгезии --- *агглютининов*, обеспечивающих взаимное связывание клеток. Феромоны индуцируют также экспрессию генов *fus1* и *fus2*, белковые продукты которых локализуются на вершинах клеточных отростков и обеспечивают слияние взаимодействующих клеток.

**Слияние гамет.** Место слияния мембран сперматозоида и яйцеклетки обычно ограничено областью связывания сперматозоида. В ооцитах многих животных в этой области часто возникает особый цитоплазматический вырост --- *конус оплодотворения* (рис. 2-12), и образуются многочисленные микроворсинки, охватывающие сперматозоид. Актиновый цитоскелет микроворсинок служит источником энергии, направленной на погружение мужской гаметы в яйцо

Молекулярный механизм слияния мембран взаимодействующих гамет еще не раскрыт полностью. Известно, что слияние плазматических мембран клеток происходит при участии особых *фузогенных белков* (белков слияния). Такими свойствами, в частности, обладают НА-белок вируса гриппа и F-белок вируса Сендай. Характерной особенностью этих белков является наличие домена гидрофобных аминокислот. Подобные белки обнаружены и в плазмалемме головки сперматозоида. Предполагается, что в этом процессе может играть роль и биндин, поскольку *in vitro* он способствует слиянию фосфолипидных пузырьков.

Слившиеся мембраны спермия и яйца образуют единую систему, так что у морского ежа специфический гликопротеин 210~кДа плазматической мембраны спермия через 45 минут после слияния гамет рассеивается по всей плазматической мембране зиготы.

**Активация ооцита и блокирование полиспермии.** Слияние мембран взаимодействующих гамет не только обеспечивает проникновение ядра сперматозоида в яйцо, но и является фактором активации последнего. Одновременно возникают разнообразные явления, препятствующие множественному проникновению сперматозоидов, или *полиспермии*, поскольку последняя ведет к серьезным нарушениям развития и даже к гибели зародыша

(рис. 2-13). У морского ежа одним из следствий связывания сперматозоида оказывается быстрое и кратковременное возрастание поступления  $\text{Na}^+$  в яйцо, которое, возможно, обусловлено действием акросомных белков на  $\text{Na}^+$ -каналы. Увеличение концентрации  $\text{Na}^+$  в клетке ведет к ее *деполяризации*, связанной с резким изменением *потенциала покоя*. Перед оплодотворением потенциал покоя яйца морского ежа составляет около  $-70\text{~mV}$ . Спустя несколько секунд после слияния мембран гамет он возрастает до  $+20\text{~mV}$ . При этом плазматическая мембрана яйца теряет способность к взаимодействию с мембраной добавочных спермиев. Это явление называют *быстрой блокировкой полиспермии*. При сохранении потенциала покоя на уровне  $-70\text{~mV}$  или при низкой концентрации  $\text{Na}^+$  в среде полиспермия не блокируется. Наоборот, при искусственном поддержании в неоплодотворенном яйце положительного потенциала, взаимодействие гамет (и, следовательно, оплодотворение) становится неосуществимым.

Важным элементом молекулярного механизма активации яйца при оплодотворении служит изменение концентрации внутриклеточного свободного кальция ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ). Временное увеличение  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  лежит в начале сложного каскада сигналов, которые, по-видимому, регулируют разнообразные функции яйцеклетки вплоть до транскрипции генов. Полагают, что амплитуда, частота и локализация кальциевых сигналов может кодировать некую информацию, которая предопределяет нормальное развитие событий в одноклеточном зародыше.

До недавнего времени существовало представление о том, что у первичноротых животных (аннелиды, моллюски, членистоногие) и у вторичноротых (иглокожие, асцидии, позвоночные) механизмы формирования кальциевых сигналов существенно различаются. Полагали, что у первичноротых оплодотворение вызывает «кортикальную вспышку» --- активацию ионных каналов плазматической мембраны яйца, благодаря которой происходит синхронный приток  $\text{Ca}^{2+}$  из внешней среды по всей поверхности яйца. Этому механизму противопоставляли выведение эндогенного  $\text{Ca}^{2+}$  из внутренних депо яйцеклетки вторичноротых, которое начинается в точке проникновения сперматозоида и распространяется в виде волны по всему яйцу. Однако изучение динамики концентрации ионов кальция с помощью

конфокального лазерного сканирующего микроскопа показало необоснованность такого противопоставления. Оказалось, что и у морских ежей в момент связывания спермия с яйцом в кортикальном слое последнего происходит почти мгновенный подъем  $[Ca^{2+}]$  за счет открытия  $Ca^{2+}$ -каналов оолеммы.  $Ca^{2+}$ -волна, независимая от внешних источников кальция, наблюдалась лишь через некоторое время после этого быстрого подъема.

Описаны два главных типа динамики ионов кальция в оплодотворенных яйцах. Так, у иглокожих, рыб и амфибий обнаруживается единичная кальциевая волна. У млекопитающих и асцидий наблюдается серия многократно (12 - 25 раз) повторяющихся подъемов  $[Ca^{2+}]_i$ . Природа этих осцилляций не вполне ясна. Предполагается, что в сперматозоидах млекопитающих имеется особый осциллогенный фактор. Действительно, эффект кальциевой осцилляции можно получить в опытах по микроинъекции сперматозоида в яйцо, или же после инъекции в яйцо фактора, экстрагированного из сперматозоида.

Исследование особенностей динамики ионов  $Ca^{2+}$  после оплодотворения у новых объектов обнаруживает большее разнообразие типов, чем это предполагалось ранее. Например, у немертин вслед за «кортикальной вспышкой», возникающей через 30~сек после контакта со сперматозоидом, и характерной для первичноротых, начинается кальциевая осцилляция, типичная для млекопитающих. Эта осцилляция обусловлена периодическим высвобождением  $Ca^{2+}$  из внутреннего депо, поскольку она продолжается и при перенесении оплодотворенных яиц немертины в бескальциевую воду.

В настоящее время подробно исследованы молекулярные механизмы высвобождения  $Ca^{2+}$  из внутренних запасов яйцеклетки у вторичноротых. Ведущим событием здесь является активация G-белков, которые, в свою очередь, активируют фосфолипазу C (рис. 2-14). Этот фермент расщепляет связанный с мембраной липид фосфатидилинозитол 4,5-дифосфат на диацилглицерол и инозитолтрифосфат (ИТФ). ИТФ способствует высвобождению внутриклеточного запаса  $Ca^{2+}$ , тогда как диацилглицерол, активируя протеинкиназу C, усиливает функцию  $Na^+/H^+$  насоса. Результатом этой активации является откачка  $H^+$  во внешнюю среду, подкисление которой отмечалось уже первыми исследователями физиологии оплодотворения, описавшими выделение «кислоты оплодотворения». Рост pH внутри клетки,

который обусловлен активацией  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  насосов, служит необходимым условием для стимуляции синтеза ДНК, синтеза белков, для активации систем внутриклеточного транспорта. Как полагают, в яйцеклетке имеется фактор, возможно, ингибирующий какой-то ключевой или «критический» белок (например, один из белков рибосомы), подавление функциональной активности которого ведет к угнетению фундаментальных клеточных процессов. Гипотеза «критического белка» допускает, что имеется пороговое значение рН, превышение которого ведет к диссоциации комплекса «ингибитор/критический белок» и к активации этого белка. Эта гипотеза согласуется с данными о том, что у морского ежа клеточный транспорт активируется уже через 5 минут после оплодотворения, а репликация ДНК --- через 25 минут.

Кроме инозитол-индуцируемого пути (ICR --- *inositol-induced Ca release*) в ооцитах ряда животных обнаружен и иной механизм высвобождения кальция, который идентифицируется по специфическим, чувствительным к алкалоиду *рианодину*, рецепторам. В этом случае высвобождение  $\text{Ca}^{2+}$  из внутренних запасов индуцируется ионами кальция (CICR --- *Ca-induced Ca release*).

Повышение концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в яйце вызывает экзоцитоз кортикальных гранул. Роль  $\text{Ca}^{2+}$  в экзоцитозе была ясно продемонстрирована в опытах *in vitro* с препаратами кортекса яйца, а также в опытах, где ингибитор высвобождения  $\text{Ca}^{2+}$  прокаин подавлял активацию яйца, тогда как облегчающий транспорт  $\text{Ca}^{2+}$  ионофор А23187, напротив, активировал неоплодотворенные яйца. При очевидной доказанности роли ионов кальция в экзоцитозе кортикальных гранул в настоящее время нет ясного понимания молекулярных механизмов этого сопряжения. Поскольку между увеличением концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  и началом экзоцитоза кортикальных гранул существует продолжительная, длящаяся около 8 сек пауза, сопряжение этих процессов, по-видимому, опосредовано каким-то промежуточным звеном.

Содержимое кортикальных гранул попадает в *перивителлиновое пространство*, ограниченное плазматической мембраной яйца и желточной оболочкой. Экзоцитоз в яйцах морского ежа начинается примерно через 25 секунд после слияния гамет и длится около 40 секунд, распространяясь по поверхности яйца от точки вхождения сперматозоида (рис. 2-15). Среди разнообразных компонентов кортикальных гранул имеются сульфомукополисахариды,



протеазы и карбогидразы. Сульфомукополисахариды, связывая воду, сильно разбухают, вследствие чего желточная оболочка заметно приподнимается над поверхностью яйца, образуя *оболочку оплодотворения*. Протеазы разрушают некоторые белки оболочки и, в том числе, рецепторы биндина. Благодаря этому оболочка оплодотворения теряет способность к первичному связыванию сперматозоидов. Карбогидразы, отщепляя некоторые углеводные компоненты желточной оболочки, способствуют ее задубливанию. Все эти процессы --- образование оболочки оплодотворения, утрата ею рецепторов биндина, ее задубливание --- составляют элементы *медленной блокировки полиспермии*.

Кортикальные гранулы могут иметь разные размеры и содержать разные вещества. У морского ежа имеется строго координированная последовательность экзоцитоза разных видов кортикальных гранул, что хорошо видно на примере формирования гиалинового слоя, который образуется на поверхности зародыша. Гиалиновый слой «цементирует» бластомеры и, будучи фактором ограничения их подвижности, играет важную роль в морфогенетических процессах. Главным компонентом гиалинового слоя является белок гиалин, количество которого в неоплодотворенном яйце достигает около 0,1% общего белка. Кроме гиалина в этом слое обнаружен гомодимерный гликопротеин эхинектин и другие белки. Все эти компоненты выводятся на поверхность яйца из кортикальных гранул в определенной последовательности. Примерно через 20 секунд после активации яйца выводится гиалин и антиген 1B10, через 2 мин --- антиген 8d11, а эхинектин через 5 мин. Эта последовательность выведения, по-видимому, и предопределяет многослойность гиалинового слоя.

**Формирование мужского пронуклеуса.** Важным элементом процесса оплодотворения является преобразование ядра спермия в мужской пронуклеус. У морского ежа ядро спермия имеет коническую форму. Хроматин ядра, содержащий специфические спермийные гистоны (SpH1, SpH2), сильно конденсирован. После попадания ядра спермия в цитоплазму яйцеклетки оно утрачивает свою оболочку. Sp-гистоны фосфорилируются и заменяются «гистонами стадии дробления» (CS гистоны, *cleavage stage*) (рис. 2-16). В результате этой замены в хроматине восстанавливается обычная длина нуклеосомного повтора (210 нуклеотидов), хроматин деконденсируется, и

таким образом создаются необходимые предпосылки для возобновления репликации ДНК и транскрипции РНК.

Одновременно с преобразованием структуры хроматина происходит сборка ламинов и возникает новая ядерная оболочка. Образовавшееся гаплоидное ядро, готовое к осуществлению матричных процессов, называют *мужским пронуклеусом*. Его объем у морского ежа в 15 раз превышает объем ядра спермия (рис. 2-17). Оболочка мужского пронуклеуса имеет сложный состав. В ее образовании участвуют элементы и материнской, и отцовской природы: сохранившиеся везикулы ядерной оболочки спермия и эндоплазматической сети яйца, и в ограниченном масштабе --- компоненты мембраны, синтезированные *de novo*. Преобразование ядра спермия в мужской пронуклеус --- многоступенчатый процесс. Условия этого превращения успешно исследуются в опытах, где изолированные ядра мужских гамет методом микроинъекции вводятся в ооциты разных стадий созревания, до и после оплодотворения. В такого рода экспериментах было показано, в частности, что развитие мужского пронуклеуса не зависит от концентрации  $Ca^{2+}$ , но требует определенного уровня рН.

**Центриольный аппарат.** Вместе с ядром сперматозоида в цитоплазму яйцеклетки попадает и центриоль, которая после поворота ядра оказывается между мужским и женским пронуклеусами. Начиная с классических исследований Т. Бовери (Boveri, 1900), утвердилось представление об отцовском происхождении centrosомы зиготы. Т. Бовери считал, что в ходе оогенеза centrosома яйца утрачивается. Действительно в зрелых яйцеклетках центриоли обычно отсутствуют. Следует подчеркнуть, что исчезновение centrosомы в ходе оогенеза не имеет фатального характера, и в случае партеногенеза, естественного или искусственного, centrosома восстанавливается из материала ооцита. При активации яйца морского ежа аммонием или с помощью ионофора A23187 centrosомный антиген, исходно диспергированный по всей цитоплазме, начинает концентрироваться и, в конце концов, образует компактную centrosому, расположенную в центральной области яйца. В ходе этого процесса, еще до его завершения, вокруг формирующейся centrosомы образуется скопление радиально расположенных микротрубочек, которые разрастаются и формируют звезду. Вывод о том, что в

цитоплазме ооцита сохраняются какие-то элементы, которые при определенных условиях восстанавливают centrosому, вытекает также из экспериментов, в которых centrosому и центриоли получали *de novo* в экстрактах из неоплодотворенных яиц.

Классическое представление об отцовской природе centrosомы зародыша сравнительно недавно было поколеблено исследованиями лаборатории Джеральда Шаттена. Оказалось, что у мыши centrosома зиготы имеет материнское происхождение (Schatten et al., 1985). Не исключено, что материнская природа centrosомы характерно для всех млекопитающих.

**Синкарион.** В области центриоли формируется звезда (*спермастер*). Формирование спермастера, лучи которого, образованные микротрубочками, пронизывают всю цитоплазму яйцеклетки, представляет, по существу, создание внутриклеточной транспортной системы, которая обеспечивает сближение пронуклеусов и их последующее слияние. Женский пронуклеус, где бы он ни находился относительно точки вхождения сперматозоида, неизбежно приходит в контакт с микротрубочками звезды, после чего начинает мигрировать в направлении минус-конца микротрубочек, сближаясь, таким образом, с мужским пронуклеусом. Слияние пронуклеусов или *кариогамия* завершает процесс оплодотворения. Объединившиеся пронуклеусы образуют диплоидное ядро зиготы или *синкарион*, хотя у ряда видов самостоятельные пронуклеусы сохраняются вплоть до первого деления дробления.

В некоторых случаях активность синкариона проявляется тотчас после его возникновения. У животных, яйца которых богаты желтком, часто наблюдается естественная полиспермия, при которой в ооцит попадает несколько спермиев. У тритона *Synops*, например, в яйце бывает до 20 мужских пронуклеусов. При нормальном развитии после образования синкариона невостребованные пронуклеусы дегенерируют, и образуется нормальное митотическое веретено. Если же синкарион из зиготы удалить, то центриоли дополнительных спермиев образуют мультиполярное веретено, при этом нормальный ход дробления нарушается. В опытах с наложением лигатуры, отделяющей синкарион от дополнительных мужских пронуклеусов, выяснилось, что синкарион *Synops* является источником фактора ASSA (*accessory sperm suppression activity*). ASSA подавляет, в частности, репликацию центриолей, привнесенных

сверхчисленными сперматозоидами, и таким образом предотвращает нарушение процессов дробления.

Зиготическая centrosoma дублируется и расщепляется непосредственно перед завершением оплодотворения. Образование диплоидного ядра зиготы, восстановление способности к репликации ДНК и транскрипционной активности, наконец, формирование центриольного аппарата --- все эти процессы финального этапа оплодотворения являются необходимыми звеньями в цепи событий, подготавливающих начало следующей стадии эмбрионального развития --- стадии дробления.

#### ЛИТЕРАТУРА

Албертс~Б., Брей~Д., Льюис~Дж., и др. Оплодотворение. В кн.: Молекулярная биология клетки. Том 4. Изд. Мир. Москва. 1987. Стр. 40 --- 49.

Гилберт~С.

Гинзбург~А.~С. Оплодотворение у рыб и проблема полиспермии Изд. Наука. Москва. 1968. 351 стр.

Иванова-Казас~О.~М. Оплодотворение. В книге: Эволюционная эмбриология животных. Изд. Наука. С-Петербург. 1995. Стр. 31-36.

### ГЛАВА 3. ДРОБЛЕНИЕ

Дробление представляет собой серию последовательных делений яйца, в результате которых одноклеточная зигота превращается в многоклеточный зародыш и восстанавливается характерное для соматических клеток соотношение объемов ядра и цитоплазмы. У многих животных в период дробления происходит распределение цитоплазматических детерминант по бластомерам (*ооплазматическая сегрегация*). Наличие этих сигнальных молекул обеспечивает в разных областях зародыша дифференциальную экспрессию генов и формирование разных клеточных клонов, которые представляют собой зачатки органов и тканей. Как мы увидим при знакомстве с развитием животных, на стадии дробления часто происходит детерминация осей симметрии зародыша. В некоторых случаях циклически повторяющиеся раунды клеточной репродукции, вероятно, выполняют и функцию биологических часов, определяющих время экспрессии тех или иных событий. В результате дробления яйцо делится на клетки --- *бластомеры*. Дробление завершается формированием бластулы, морфологически недифференцированного многоклеточного зародыша, часто имеющего внутреннюю полость.

**Типы дробления.** У разных видов животных дробление имеет свою особенную организацию, характер которой определяется, прежде всего, строением яйца, в том числе и распределением и количеством желтка, а также положением митотического веретена в бластомерах относительно анимально-вегетативной оси яйца.

Дробление бывает полным (*голобластическим*), неполным (*меробластическим*) и поверхностным (*абластическим*) (рис. 3-1). Полным называется дробление, при котором яйцо делится на бластомеры целиком. При неполном дроблении деления затрагивают только часть яйца, тогда как другая часть, обычно с высокой концентрацией желтка, не делится. При поверхностном типе яйцеклетка не делится вовсе, и дело ограничивается лишь кариокинезом --- делениями ядер.

*Голобластическое дробление* (от греч. ολόζ --- целый, весь; βλαστοζ --- росток, отпрыск) характерно для яиц, содержащих сравнительно незначительное количество желтка, т.е. для олиго- и мезолецитальных, а также для умеренно телолецитальных яиц. Если в результате дробления образуются бластомеры примерно равных размеров, говорят о равномерном дроблении. Если же бластомеры явно различаются по величине --- о неравномерном (рис. 3-2). Неравномерность дробления может быть связана с концентрацией желтка в вегетативном полушарии (рис. 3-2А). Иногда она обусловлена сосредоточением в отдельных бластомерах больших объемов специализированной цитоплазмы, например, цитоплазмы полярной лопасти у некоторых моллюсков (рис. 3-2Б) или иными причинами, как в случае образования микромеров у морского ежа (рис. 3-2В).

*Меробластическое дробление* (от греч. μέρος --- часть, доля) наблюдается у животных с телолецитальными яйцами, которые отличаются высокой степенью концентрации желтка в вегетативной области. У головоногих моллюсков, многих рыб, а также у рептилий и птиц дробление происходит только в относительно небольшой части яйца, образующей как бы диск на поверхности яйцеклетки (*дискоидальное дробление*).

*Абластическое дробление* (греч. α --- в сложных словах «не») характерно для центролецитальных яиц насекомых, почему его называют также центролецитальным. В этом случае цитокинез не происходит и деление цитоплазмы отсутствует. Делятся только ядра, которые находятся в центральной области яйца, откуда они мигрируют по цитоплазматическим тягам, пронизывающим яйцо, на поверхность. Длительное время зародыш имеет синцитиальную структуру. Попав в поверхностную цитоплазматическую бластему, или *периплазму* (от греч. περί --- вокруг), ядра образуют синцитиальную бластодерму, которая позднее целлюляризуется и дает начало клеточной бластодерме зародыша.

По характеру пространственного положения бластомеров, которое они занимают в развивающемся зародыше, различают несколько типов дробления, в частности, радиальное, бирадиальное, спиральное, билатеральное, ротационное и

неупорядоченное дробление, а также табличную палинтомию и полиаксиальный тип дробления (рис. 3-3).

*Радиальное дробление.* У многих животных (книдарии, иглокожие, некоторые первично-хордовые, рыбы и амфибии) дробящееся яйцо имеет радиальную ось симметрии, при которой плоскость, проведенная через любой меридиан, делит зародыш на две геометрически тождественные половины. При радиальном дроблении два первых деления проходят во взаимно перпендикулярных меридиональных плоскостях, а третье --- в экваториальной плоскости. Последующие деления чередуются в широтной и меридиональной плоскостях. Если третье деление происходит в экваториальной плоскости, то дробление *равномерное*, если же плоскость этого деления смещена в анимальное полушарие, то дробление --- *неравномерное*, ведущее к образованию микромеров в анимальном и макромеров в вегетативном полушариях.

*Спиральное дробление.* У аннелид и моллюсков в результате первых двух взаимно перпендикулярных меридиональных делений образуется стадия четырех бластомеров. Начиная с третьего деления дробления, митотические веретена располагаются под некоторым углом к меридиональной плоскости. Благодаря этому образующиеся четыре клетки анимального полушария несколько смещаются относительно клеток вегетативного квартета и располагаются в промежутках между его бластомерами (*квадрантами*) (рис. 3-4). Если смещение происходит по часовой стрелке (при рассматривании с анимального полюса), дробление называют *дексиотропным* (от лат. dexter --- правый), если же смещение происходит в противоположном направлении, дробление называют *леотропным*. При последующих делениях наклоны веретен чередуются: за дексиотропным следует леотропное деление и наоборот. В случае спирального дробления его неравномерность может обнаружиться уже после первого деления дробления. Если на стадии 4-х бластомеров все клетки одинаковых размеров, говорят о *гомоквадрантном* дроблении, если же они по размерам различаются, то --- о *гетероквадрантном* (рис. 3-5).

Неравномерность дробления может проявляться и вдоль анимально-вегетативной оси: при достаточно больших запасах желтка основной (вегетативный) квартет представлен макромерами, а анимальный --- микромерами. В ходе спирального

дробления blastomeres занимают строго фиксированное положение в системе и обозначаются специальными индексами (см. подробнее 8.1).

*Билатеральный тип дробления* (рис. 3-6) характерен для нематод, а также для многих низших хордовых, в том числе для асцидий, аппендикулярий и бесчерепных. Характерной особенностью этого типа является раннее проявление билатеральной симметрии. Например, у оболочников подразделение на левую и правую части происходит уже при первом меридиональном делении дробления, плоскость которого рассекает желтый серп оплодотворенного яйца на две симметричные половины. Билатеральность становится очевидной, когда вторая, тоже меридиональная борозда отделяет более крупные передние blastomeres от задних клеток, имеющих более мелкие размеры.

Некоторые авторы выделяют в особый, *ротационный*, тип дробления млекопитающих, у которых blastomeres при втором дроблении делятся во взаимно перпендикулярных плоскостях. Наконец, у некоторых животных описано вращение blastomeres. Изменение положения blastomeres относительно анимально-вегетативной оси, вероятно, характерно для ряда кишечнополостных. Согласно некоторым исследованиям, у книдарий иногда наблюдается слабая взаимосвязь между клетками, которая приводит к возникновению так называемого *анархического* или неупорядоченного дробления (см. 7.1).

Что определяет характер дробления? От чего зависит положение плоскости дробления? Что является причиной того или иного расположения митотического веретена? Конечно, характер дробления, как мы видели, отчасти определяется особенностями распределения желтка в яйцеклетке: увеличение концентрации желтка обычно приводит к замедлению образования борозд в вегетативном полушарии или даже к полному прекращению делений. В этих случаях наблюдается меробластическое или абластическое дробление.

Вместе с тем, очевидно, что особенности того или иного типа дробления являются результатом длительной эволюции и контролируются не только концентрацией желтка, но многими факторами, природа которых во многом остается еще не раскрытой.



Сравнение разных типов дробления у животных позволило выдающемуся немецкому исследователю конца 19-го --- начала 20 -го столетия О.~Гертвигу вывести эмпирические правила («правила Гертвига»), которые, как первоначально казалось, дают ключ к пониманию того или иного положения плоскости деления яйца или бластомеров. Согласно одному из этих правил, ядро в яйцеклетке или в бластомере занимает центр «активной» (то есть незагруженной желтком) цитоплазмы. Таким образом, при асимметричном расположении активной цитоплазмы предопределяется и аналогичное положение ядра. Согласно другому правилу Гертвига, ось веретена деления совпадает с направлением наибольшей протяженности цитоплазмы. Во многих случаях правила, установленные Гертвигом, оправдываются. Тем не менее, они верны не всегда и, очевидно, будучи лишь результатом визуального анализа, эти правила не раскрывают реальных механизмов детерминации плоскостей дробления.

Выполненные уже в конце 1930-х годов известным шведским эмбриологом Свенном Герстадиусом (1NB --- 19NB) опыты на морском еже показали, что положение веретен в последовательные моменты дробления предопределяется какими-то процессами, происходящими в цитоплазме, которые активируются после оплодотворения. Герстадиус обнаружил, что, помещая яйца морского ежа в гипотоническую среду или подвергая их встряхиванию, можно задержать то или иное деление дробления. При этом оказалось, что время появления того или иного положения веретена относительно момента оплодотворения остается неизменным. Например, если задержать первое деление на один цикл, то экваториальное деление, которое в норме является третьим, произойдет на стадии двух бластомеров, хотя при нормальном развитии для этой стадии характерно меридиональное деление. Как известно, микромеры вегетативного полушария у морского ежа возникают при четвертом делении дробления, т.е. на стадии образования 16-клеточного зародыша. Однако, при задержке третьего деления дробления формирование микромеров происходит строго «по расписанию», т.е. через такое же время после оплодотворения, что и при нормальном развитии, но на стадии 4-х бластомеров, а не 8-и, как при нормальном развитии (рис. 3-7).

Из опытов Герстадиуса вытекало два важных следствия. Во-первых, они свидетельствовали, что в дробящемся яйце имеется некий счетчик времени, который, будучи независимым, тем не менее, сопряжен с процессами, непосредственно контролирующими кариокинез. Во-вторых, эти опыты указывали на существование механизма, который предопределяет последовательный ряд событий, реализующих генетически детерминированную ориентацию веретен деления.

Важный вклад в понимание проблемы дробления примерно в то же время внесла американский эмбриолог Е. Гарвей, работы которой также показали, что механизмы кариокинеза и цитокинеза относительно автономны и могут быть разобщены в эксперименте. Центрифугируя неоплодотворенные яйца морского ежа в растворе сахарозы той же плотности, что и яйца, она смогла разделить яйцо на две половины (*мерогонь*). В легкой половине оставалось ядро, а в тяжелой концентрировался желток и пигментные зерна. После активации гипертонической морской водой наблюдалась партеногенетическая *мерогония*: безъядерные половинки начинали дробиться, и формировали аномальные бластулы, которые после вылупления погибали, поскольку составляющие их клетки не имели ядер.

Относительная автономия кариокинеза и цитокинеза обусловлены тем, что в их основе лежат различные клеточные механизмы. Поскольку эти механизмы и, в частности, роль цитоскелета в осуществлении клеточного деления подробно рассматриваются в курсах цитологии, здесь мы ограничимся лишь кратким упоминанием о них.

Кариокинез происходит при участии митотического веретена, основу которого составляют микротрубочки, построенные из белка тубулина. Цитокинез осуществляется сократительным кольцом, которое образуется в области борозды дробления из актиновых микрофиламентов. Если дробящееся яйцо обработать ингибитором микротрубочек (например, колхицином или нокодазолом), то кариокинетические деления блокируются в метафазе. При действии ингибиторов микрофиламентов (например, цитохалазина) деление ядер сохраняется, но подавляется цитокинез.

При нормальном развитии образование веретена и борозды дробления скоординированы. Уже давно была отмечена связь между митотическим веретеном и положением борозды дробления: последняя всегда проходит в плоскости метафазной пластинки, перпендикулярно длинной оси веретена. Экспериментальные воздействия, ведущие к изменению положения веретена, неизбежно вызывают смещение борозды дробления в соответствии с новым положением веретена. Неудивительно поэтому, что появление сверхчисленных веретен (например, при полиспермии) резко нарушает нормальный ход развития (рис. 2-15), а разрушение звезд веретена ведет к остановке дробления. Возможно, однако, что образование борозды дробления зависит главным образом от взаимодействия двух звезд, поскольку в экспериментальных условиях удается вызвать появление борозды между звездами, не связанными между собой веретеном. Можно предполагать, что область формирования сократительного кольца микрофиламентов определяется взаимодействием микротрубочек звезд с кортексом яйца.

Положение митотического веретена, а, следовательно, и звезд зависит не только от элементов цитоскелета, но и от других цитоплазматических факторов, хотя реальный механизм их действия пока не известен. Например, у животных со спиральным типом дробления обнаружено, что ориентация плоскости третьего деления в правую или левую сторону (т.е. декситропность или леотропность) контролируется цитоплазматическим фактором, который синтезируется под контролем генов материнского организма в период оогенеза. Значение этого фактора было показано как в опытах, где цитоплазму из яиц одного типа инъецировали в яйца другого типа, так и в генетических исследованиях закрученности раковины у моллюска *Lymnaea*, которое коррелирует с ориентацией веретена при дроблении. Так, у *Lymnaea* аллель правозакрученности D доминантен, а левозакрученности d ---рецессивен. При скрещивании самок DD с самцами dd все потомки Dd были правозакрученными. При скрещивании самцов DD с самками dd все потомки Dd были левозакрученными, а при скрещивании самцов Dd с самками Dd потомки (1DD: 2Dd: 1dd) были все правозакрученными.

В настоящее время эмбриология не располагает данными, которые позволили бы дать сколько-нибудь связный очерк механизмов, лежащих в основе формирования

тех или иных конкретных типов дробления. Тем не менее, даже те отрывочные сведения, которые имеются в нашем распоряжении, позволяют утверждать, что *тип дробления определяется сложным комплексом факторов, в том числе генетическими и клеточными механизмами, которые контролируют и интегрируют многие элементарные процессы.* Среди последних особое значение имеют события, связанные с синтезом ДНК, организацией митотического деления ядра (кариокинез) и делением цитоплазматического тела клетки (цитокинез). Относительная автономия этих элементарных процессов создает предпосылки для формирования в ходе эволюции животных разнообразных типов дробления. Например, в основе возникновения поверхностного типа дробления лежит возможность разобщения кариокинеза и цитокинеза.

**Особенности клеточного цикла в период дробления.** Дробление оплодотворенного яйца представляет собой *палитомический процесс* (от греч. *παλιν* --- опять, снова; *τομή* --- разрезание, разделение), для которого характерен непрерывный ряд клеточных делений, следующих один за другим без компенсаторного роста клетки (рис. 3-8А). У соматических клеток, сохранивших способность к пролиферации, наблюдается *монотомия* (греч. *μονοζ* --- один, единственный), при которой после митотического деления наступает период роста клетки, а следующее деление возможно лишь при достижении определенной массы. Клеточный цикл монотомического типа характеризуется тем, что фаза синтеза ДНК и фаза митотического деления разделены во времени фазами G1 (пресинтетическая фаза) и G2 (премитотическая фаза), в течение которых происходит рост клетки, а также подготовка к репликации ДНК и митозу (рис. 3-8Б). При делениях дробления синтез ДНК одного цикла, как правило, начинается уже в телофазе предыдущего деления, так что фаза М и фаза S перекрываются. Этот сверххранний синтез ДНК начинается на еще не вполне деконденсированных хромосомах, т.е. до восстановления структуры интерфазного ядра. Синтез ДНК обычно инициируется в *кариомерах* (от греч. *καριον* --- орех, ядро; *μεροζ* --- часть, доля), которые представляют собой отдельные хромосомы, окруженные собственной оболочкой, состоящей из двух мембран. Впоследствии кариомеры сливаются между собой, образуя типичное интерфазное ядро. Можно предполагать, что сверххранний синтез ДНК, наблюдаемый при дроблении, коррелирован с формированием оболочек вокруг отдельных хромосом.

Благодаря палинтомии происходит постоянное уменьшение массы отдельных клеток в ходе дробления. Отсутствие компенсаторного роста ведет к восстановлению обычного для соматических клеток ядерно-цитоплазматического отношения. Клеточные циклы в период дробления отличаются от циклов соматических клеток не только особенностями своей структуры. Важной особенностью, имеющей очевидный адаптивный характер, является высокая скорость прохождения клеточного цикла, его быстротечность, предопределяющая высокую частоту клеточных делений. Например, у Дрозофилы деления ядер в это время происходят при 24<sup>0</sup> С каждые 9,5 минут, причем синтез ДНК продолжается не более 3,5 минут, тогда как у взрослых животных генерационное время в разных тканях исчисляется многими часами (генерационное время около 20 час, фаза S --- 10 час.).

Скорость репродукции генетического материала в период дробления у животных сравнима со скоростью репликации генома бактерии *Escherichia coli*. Столь быстрый синтез ДНК возможен благодаря тому, что нить ДНК в хромосоме эукариот подразделена на большое число относительно автономных единиц репликации ---репликонов. В период дробления имеет место высокая степень синхронности репликации всех репликонов (рис. 3-9). По завершении периода дробления организация репликации изменяется. При этом устанавливается определенная последовательность репликации разных участков ДНК во времени. Известно, например, что транскрипционно активные участки ДНК, входящие в состав эухроматина, репродуцируются в начале фазы синтеза ДНК, тогда как гетерохроматиновые участки реплицируются в конце этой фазы, длительность которой при этом возрастает до нескольких часов.

У большинства видов различают периоды синхронного дробления и период асинхронного дробления, хотя у ряда животных (губки, некоторые кишечнополостные и нематоды, млекопитающие и др.) дробление с самого начала носит асинхронный характер. Десинхронизация дробления связана с изменением структуры цикла: увеличением продолжительности фазы S, появлением «gap» фаз (G<sub>1</sub> и G<sub>2</sub>). Эта перестройка цикла обычно коррелирует с интенсификацией транскрипционной активности зиготического генома.

Факторы, инициирующие и контролирующие циклический процесс клеточной репродукции, имеют цитоплазматическую локализацию. Действительно, частота делений, длительность синтеза ДНК у межвидовых гибридов имеют те же характеристики, что и материнский вид (таблица 3.1). Темп клеточных делений у одного вида можно изменить, инъецируя цитоплазму другого вида. При этом свойство изменять частоту делений цитоплазма яйца приобретает только после разрушения зародышевого пузырька, когда смешиваются цитоплазма и кариоплазма.

В качестве осцилляторов ритмических процессов в дробящемся яйце рассматривались колебания энергетического метаболизма, связанные с периодической активацией гликолитической системы. Пристальное внимание привлекали, например, тиоловые циклы, связанные с периодическими изменениями содержания SH-групп. Оказалось, что подавление тиоловых циклов ведет к нарушению делений. Было показано, что SH-белки связаны с активацией ДНК-полимеразы, в связи с чем возникла идея о возможной функции этих белков в регуляции периодичности синтеза ДНК. С другой стороны, было обнаружено, что повышение уровня SH-групп в тубулине способствует его полимеризации в микротрубочки. Экспериментально показана роль биогенных моноаминов в периодических явлениях цитотомии (Г.~Бузников, 19NB). В 1980-х годах была предложена гипотеза автономного осциллятора (Newport, Kirschner, 1984), согласно которой в дробящемся яйце лягушки клеточный цикл контролируется осциллятором, важную роль в активности которого играет так называемый фактор созревания (рис. 3-10). У амфибий появление этого цитоплазматического фактора, обладающего способностью активировать клеточную пролиферацию, совпадает с гормональной стимуляцией ооцита. Известно, что первое мейотическое деление созревания ооцита *Xenopus*, находящегося в профазе 1-го деления созревания, происходит при стимуляции прогестероном. Оказалось, что если в цитоплазму такого стимулированного прогестероном ооцита интродуцировать ядро, взятое из терминально дифференцированной, прекратившей клеточную пролиферацию клетки (например, из нервной клетки взрослого животного), то это ядро вновь приобретает способность к кариокинезу. С другой стороны, если в оплодотворенное яйцо *Xenopus*, из которого предварительно удалено ядро

(энуклеированное яйцо), ввести с помощью микропипетки клонированные фрагменты ДНК, то эти фрагменты будут периодически реплицироваться, причем ритм репликации этой экзогенной ДНК соответствует периодичности синтеза ДНК в нормальном ядре.

Поиск молекул, инициирующих деления созревания ооцитов *Xenopus*, привел к обнаружению фактора созревания, или MPF (*maturation promoting factor*), сложного фосфопротеина, состоящего из двух субъединиц. Впоследствии оказалось, что MPF выполняет свою функцию не только при мейозе, но имеет более широкое значение как фактор регуляции митотических клеточных циклов, так что теперь аббревиатура MPF расшифровывается как *mitosis promoting factor*. Было установлено, что активность MPF изменяется циклически: она достигает максимальных значений в митозе и существенно падает в фазе синтеза ДНК (рис. 3-11). Оказалось при этом, что обнаруженная цикличность не связана непосредственно с ядром, поскольку она наблюдается и в энуклеированных яйцах.

Если дробящееся яйцо обработать ингибитором, подавляющим синтез белка, то дробление окажется заблокированным в интерфазе. Микроинъекция очищенной фракции MPF в такое яйцо восстанавливает процесс клеточной репродукции: после инъекции наблюдаются разрыв ядерной оболочки, конденсация хромосом и характерная реорганизация цитоскелета, связанная с подготовкой к митозу.

Изучение структуры MPF показало, что малая субъединица комплекса представляет собой *протеинкиназу*. Наличие этой протеинкиназы обеспечивает фосфорилирование ряда белков. В частности, фосфорилирование гистона H1 ведет к конденсации хромосом, а гиперфосфорилирование белков ядерной оболочки (ламинов) служит предпосылкой разборки этой оболочки. Протеинкиназа MPF обладает высокой степенью консервативности, она идентична белку p34 дрожжей, который контролируется одним из генов регуляции клеточного цикла (так называемые *cdc-гены*, *cell division cycle*), а именно, геном *cdc 2* (p34<sup>cdc2</sup>). У мутантных по гену *cdc2* форм дрожжей митотические деления подавлены. Однако, если в этих мутантов интродуцировать ген малой субъединицы MPF, то деление дрожжевых клеток восстанавливается.

Большая субъединица MPF представляет собой белок 56 кДа, идентичный дрожжевому белку p56<sup>cdc13</sup>. Этот белок был назван *циклином*, поскольку его взаимодействие с протеинкиназой периодически меняется в ходе клеточного цикла. Оказалось, что активность взаимодействия начинает расти в S фазе цикла, достигает максимума в начале митоза, но на границе метафазы и анафазы резко падает из-за быстрой деградации белка (рис. 3-11). Распад циклина ведет к инактивации малой субъединицы MPF. После инактивации протеинкиназы прекращается фосфорилирование гистона H1, ламинов и других белков-мишеней, а это, в свою очередь, вызывает завершение митоза и переход в интерфазу.

В яйцах *Xenopus* был выявлен цитостатический фактор CSF (*cytostatic factor*), контролируемый геном *c-mos*. Этот фактор блокирует мейоз в метафазе второго деления созревания (рис. 3-10). Оказалось, что блокирующее действие CSF обусловлено тем, что он предотвращает деградацию циклина. В результате сохраняется активность MPF, и клетка не может выйти из митоза. При оплодотворении, как мы знаем, в яйце происходит увеличение концентрации ионов Ca<sup>2+</sup>, что вызывает инактивацию CSF и завершение делений созревания.

Если в период дробления синтез циклина и других активаторов протеинкиназы идет на материнских матрицах, запасенных в период оогенеза, то к концу дробления этот запас исчерпывается. Так, после 13-го деления у дрозофилы происходит деградация материнской string-иРНК и на 14-ом цикле начинается ресинтез зиготической формы этого белка, активатора протеинкиназы. Возможно, что это обстоятельство является одной из причин замедления и десинхронизации делений клеток, наблюдаемых в это время.

**Ооплазматическая сегрегация.** В ходе дробления происходит распределение различных веществ, содержащихся в цитоплазме яйцеклетки, по бластомерам. При этом разные сорта цитоплазмы попадают в клетки, которые дают начало разным зачаткам. Так, наиболее богатые желтком вегетативные участки яйца попадают при дроблении в бластомеры, которые дают начало энтодерме.



Особое значение для судьбы развивающегося зародыша имеет, однако, сегрегация инструктивных молекул, наблюдаемая в период дробления у многих животных. Попадая в те или иные бластомеры, эти синтезированные в период оогенеза цитоплазматические факторы активируют специфические программы развития. Значимость дробления, как инструмента закономерного распределения цитоплазматических детерминант в пространстве, весьма велика.

Истоки современных исследований цитоплазматической локализации морфогенетических факторов в раннем эмбриональном развитии обнаруживаются в эмбриологических работах конца 19-го столетия. По-видимому, А.~О.~Ковалевский (1840 --- 1901), изучавший эмбриональное развитие аннелид, впервые (1871) описал стволовые клетки мезодермы *телобласты* (от греч. *τελος* --- конец, окончание; *βλαστος* --- росток), деление которых дает начало образованию парных мезодермальных полосок червя. Позднее у пиявки *Clepsine* К.~Уитменом были описаны (1878) не только мезобласты, но и нейробласты, дающие, соответственно, мезодермальную и нейральную зачатковые полоски.

Благодаря относительно небольшому числу клеток у зародышей аннелид и моллюсков и в высшей степени консервативному характеру дробления удалось с большой точностью проследить судьбу каждого бластомера. При этом оказалось, что в основе формирования разных структур животного лежит образование клеточных клонов путем деления специфических индивидуальных бластомеров. Так, у полихеты *Polygordius* клетки прототроха возникают из шестнадцати *трохобластов*, личиночные органы выделения, протонефридии, из *нефробластов*, передняя кишка из *стоматобластов* и т.п. Такой принцип формирования тела, сущность которого состоит в том, что бластомеры в ходе дробления становятся основателями клонов специфически дифференцирующихся клеток, можно назвать *телобластическим*. Развитие с образованием клеток-основательниц клонов широко распространено у животных. Существование телобластов свидетельствует о том, что у зародыша имеются генетически обусловленные механизмы дробления, которые обеспечивают строгое наследование данным бластомером определенной области цитоплазмы яйца. Распределение разнородных компонентов цитоплазмы ооцита по зародышу создает своеобразную мозаику

цитоплазматических детерминант, почему такой тип развития и стали называть *мозаичным*.

Детерминированный характер бластомеров, возникающих в ходе мозаичного дробления подтвердился в многочисленных экспериментах по изоляции или устранению бластомеров и частей зародыша.

Оказалось, что после содержания в бескальциевой морской воде зародыш моллюска *Patella* распадается на отдельные клетки. После переноса в нормальную среду эти изолированные клетки могут продолжить развитие. При этом, например, трохобласты сохраняют нормальный ритм делений, а их потомки, как и при нормальном развитии, образуют группы ресничных клеток. Изолированные макромеры основного квартета дают энтодермальные клетки, а клетки анимального полушария --- сенсорные (чувствительные) клетки.

У малощетинкового червя *Tubifex* яйцо в полярных областях имеет два скопления свободной от желтка и богатой митохондриями цитоплазмы (рис. 3-12). Благодаря активности цитоскелета яйца (рис. 3-13) эти полярные зоны соединяются в общую массу, которая в процессе дробления попадает сначала в бластомер CD, а затем в макромер D. Если ультрафиолетовым облучением убить клетки, содержащие полярную плазму, то в ходе развития возникают уродливые зародыши, состоящие из скопления энтодермальных клеток, прикрытых эктодермальным колпачком. Если же облучить все клетки, кроме бластомера D, то среди потомков последнего, как и в норме, образуются первый и второй соматобласты --- клетки 2d и 4d, которые содержат материал полярной плазмы и дают соответственно эктодерму и мезодерму. Если убить бластомер 2d, то подавляется развитие эктодермы зародыша, тогда как мезодерма дифференцируется нормальным образом. Более того, за счет потомков второго соматобласта, дающего в норме мезодерму, возникают типично эктодермальные производные: эпидермис, нервная система и передняя кишка. При облучении бластомера 4d или мезодермальных телобластов развитие мезодермы полностью подавляется, тогда как дифференциация эктодермы происходит нормально. Опыты на олигохете *Tubifex* интересны тем, что они обнаружили не только роль полярной плазмы в процессах

дифференциации и высокую степень детерминативности дробления червей, но и способность к регуляции повреждений за счет мезодермальных клеток.

Существование цитоплазмы, попадание которой в бластомеры коррелирует с определенной дифференциацией их потомков, не ограничивается только аннелидами и моллюсками, а широко распространено и у других типов животных, в частности, у некоторых вторичноротых животных. Классическим объектом исследований локализации морфогенетических потенциалов в яйце вторичноротых служат асцидии. Эти исследования, начатые в конце 19-го --- начале 20-го столетия известным американским эмбриологом Эдвином Конклином (NB --- NB), продолжаются и в наши дни. Счастливой для эмбриолога особенностью этого объекта явилось то, что разные области яйца многих асцидий имеют разную пигментацию, что существенно облегчило прижизненное изучение перемещения и локализации разных видов цитоплазмы.

У асцидии *Styela partita* Конклин (1905) описал 5 видов цитоплазмы яйца: темно-желтую, светло-желтую, светло-серую, темно-серую и, наконец, прозрачную. После оплодотворения или искусственной активации яйца происходит перераспределение цитоплазмы, которое можно наблюдать визуально. В результате билатерального дробления различные виды цитоплазмы распределяются по разным бластомерам. Уже на стадии 4-х бластомеров выявляется сагиттальная плоскость, которая проходит через середину желтого серпа. Эта плоскость разделяет левую и правую пары бластомеров с каждой стороны. При этом более крупные бластомеры соответствуют переднему концу, а более мелкие – заднему. При втором делении дробления цитоплазма желтого серпа симметрично распределяется по двум задним бластомерам. Третье деление проходит в экваториальной плоскости.; при этом материал желтого серпа оказывается в задних вегетативных бластомерах, темно-серая цитоплазма --- в вегетативных бластомерах, светло-желтая --- в клетки, дающие целомическую мезодерму личинки. На стадии гастрюлы светло-серая цитоплазма попадает в клетки-предшественницы хорды и нервной ткани, темно-серая --- в клетки, дающие начало энтодерме, а прозрачная цитоплазма оказывается в клетках будущей эктодермы (рис. 3-14).

Свои выводы Конклин обосновал не только описанием судьбы бластомеров при нормальном развитии, но и в опытах с умерщвлением бластомеров. Оказалось, что развитие изолированных бластомеров носит детерминированный характер и соответствует тому, что наблюдается при нормальном эмбриогенезе. Современные исследования в принципе подтвердили выводы Конклина, хотя и внесли в них ряд уточнений. Показано, что у зародыша асцидий уже в период дробления происходит экспрессия генов, специфических для разных зачатков.

Происходящая в период дробления ооплазматическая сегрегация лежит в основе явления автономной детерминации (см. том 2, гл.16), которая наряду с эмбриональной индукцией (см. том 2, гл. 17), представляет собой один из важнейших модусов детерминации зачатков зародыша.

**Детерминативный и регулятивный типы развития.** Традиционно в эмбриологии различают животных с детерминативным и регулятивным типом развития. При этом под детерминативным (от лат. *determinatio* --- определение) понимают развитие, при котором предварительное определение судьбы клеток происходит в период дробления, еще до начала морфогенетических движений клеточных масс. Детерминативный характер развития присущ представителям *Stenophora*, *Lophotrochozoa*, *Ecdysozoa* и низшим *Deuterostomia*. Регулятивный тип развития с относительно поздним определением судьбы зачатков характерен для многих кишечнополостных и высших *Deuterostomia*. У позвоночных животных, как это было показано еще московским эмбриологом А.~А.~Нейфахом (1962), активность собственного генома и детерминация зачатков наблюдаются обычно после завершения дробления, на стадии, когда зародыш образован многими тысячами клеток.

У насекомых с синцитиальной структурой зародыша, возникающей при абластическом типе дробления, образование клонов (за исключением рано обособляющихся первичных половых клеток) в период дробления невозможно в принципе. Спецификация клеток у этих животных происходит только на стадии целлюляризации в соответствии с позиционными сигналами, установка которых осуществляется еще в период оогенеза.

Здесь будет уместно заметить, что под *детерминацией* зачатка понимается совокупность процессов, благодаря которым устанавливается (определяется) судьба его развития. Если речь идет о детерминации отдельных клеток, чаще используется термин *коммитирование* (от англ. commitment --- арест). Ранний, обратимый этап детерминации, в течение которого происходит первоначальное программирование судьбы зачатка или клетки, называют спецификацией (от англ. specification --- определение, уточнение).

Естественным следствием ранней детерминации клеток является снижение регулятивных потенций зародыша. Напротив, способность к регуляции должна сохраняться дольше в развитии тех животных, у которых судьба клеток детерминируется на относительно поздних стадиях эмбриогенеза. Подразделение на регулятивный и детерминативный типы развития весьма условно. По мере накопления сведений о молекулярно-биологических особенностях раннего эмбриогенеза, по-видимому, все труднее будет проводить резкую грань между названными типами развития. Скорее их можно рассматривать, как основные тенденции эволюции эмбриогенеза. При детерминативном типе развития на первый план выступает клеточный механизм формирования тела за счет специфического паттерна дробления, в ходе которого зачатки зародыша или клетки-родоначальницы этих зачатков занимают строго определенное положение в пространстве. Спецификация клеток-основательниц клонов, которые впоследствии формируют разные зачатки зародыша, коррелирует с ранней экспрессией генов. У морских ежей, у которых зародыши в конце дробления представлены мозаикой клеток с разной судьбой, транскрипция начинается сразу же после оплодотворения. Расчеты показывают, что у морских ежей транскрипция (в расчете на одно ядро) достигает максимального уровня именно на средних стадиях дробления (Davidson, 2000).

Ограниченные формообразовательные возможности при детерминативном типе развития в процессе эволюции преодолевались разными способами. Один из них, возможно, состоял в достройке онтогенеза примитивных анцестральных форм, отражением которых служат личинки некоторых современных морских билатеральных беспозвоночных (см. гл.5 и гл. 24). Другой путь, по-видимому, был связан с появлением механизмов, обеспечивавших отсрочку детерминации

клеток зародыша, которая была обусловлена длительной паузой транскрипции, продолжавшейся до стадии бластулы включительно. Благодаря длительному выключению транскрипции в период дробления происходило, в основном, накопление клеточной массы. При этом цитоплазматические детерминанты материнского происхождения могли оказывать свое действие, главным образом, лишь после достижения стадии, на которой начинаются морфогенетические движения.

Как предполагает известный американский исследователь Э. Дэвидсон (2000), если спецификация клеток и зачатков у животного происходит в период дробления, то пространственная организация тела создается на уровне паттерна дробления: т.е. она предопределяется, прежде всего, осями яйцеклетки и положением веретен делений дробления относительно этих осей. У животных с поздней спецификацией зачатков, по Дэвидсону, имеются особые системы генетической регионализации зародыша, которые будут рассмотрены во втором томе.

Прежние представления о причинах ранней детерминации клеток в эмбриогенезе базировались исключительно на предположении об ооплазматической сегрегации, в ходе которой происходит асимметричное распределение цитоплазматических факторов яйца, инициирующих то или иное направление дифференциации клеток. В настоящее время очевидно, что в качестве механизма ранней детерминации бластомеров может выступать и индуктивное взаимодействие клеток, обусловленное передачей неких сигналов от клетки к клетке.

**Бластула.** Процесс дробления завершается образованием бластулы --- обычно однослойного многоклеточного зародыша, состоящего из внешне недифференцированных клеток. В настоящее время мы знаем, однако, что эти клетки во многих случаях определенным образом специфицированы. Четкой границы, отделяющей стадию дробления от стадии бластулы, не существует. Эта граница достаточно условна. Тем не менее, в отношении каждого конкретного вида обычно имеются вполне определенные критерии, которые позволяют не только отличать стадию бластулы от более ранних и более поздних этапов развития, но и подразделять стадию бластулы на раннюю, среднюю и позднюю.

Разнообразные типы дробления, естественно, дают огромное число разновидностей бластулы. Бластулы некоторых животных имеют полость --- *бластоцель*. Эта полость носит название первичной, или Бэрвской полости животного. Клетки бластулы поляризуются. Обращенные к полости базальные поверхности клеток формируют базальную мембрану. Благодаря активности бластомеров бластоцель заполняется жидкостью, объем которой может возрастать и играть определенную формообразовательную роль.

Однослойный сферический зародыш с обширной первичной полостью называется *целобластулой* (рис. 3-15 А). При неравномерном дроблении телolecитальных яиц бластоцель расположен в анимальном полушарии (рис. 3-15 Б). В этом случае стенка бластулы, образованная мелкими клетками анимального полушария образует *крышу*, а крупноклеточная стенка вегетативного полушария --- *дно* бластулы. Если в конце дробления образуется зародыш без полости, его называют *морулой* (от лат. *morula* --- тутовая ягода) (рис. 3-15 Д). В отличие от морулы, где бластомеры образуют плотный конгломерат, в котором имеются и периферические и внутренние клетки, однослойную бластулу без выраженной полости, образованную высокими цилиндрическими клетками, называют *стерробластулой* (от греч. *στερος* --- твердый, плотный) (рис. 3-15 В,Г). В тех случаях, когда полость бластулы занята желточными включениями, например, при развитии насекомых, а на поверхности желтка располагается слой клеток --- *бластодерма*, зародыш называют *перибластулой* (от греч. *περι*--- вокруг). При дискоидальном типе дробления образуется *дискобластула* (рис. 3-15 Е) --- уплощенный зародыш со щелевидной подзародышевой полостью между бластодермой и желтком.

У низших позвоночных животных, бластула которых образована многими слоями клеток, различают раннюю или *бластомерную* бластулу, и позднюю *эпителиальную* бластулу, поверхностные клетки которой связаны между собой межклеточными контактами.

В некоторых сравнительно редких случаях разные области бластулы имеют признаки морфологической дифференциации. Так, например, дробление у некоторых губок завершается образованием зародыша, одна половина которого

представлена мерцательными клетками со жгутиками, а другая --- крупными зернистыми клетками. Такой тип зародыша носит название *амфибластулы* (от греч. αμφι- --- с обеих сторон) (см. гл. 6).

**Дробление как счетчик времени.** При исследовании ряда физиологических и биохимических свойств зародышей позвоночных, в частности амфибий, оказалось, что многие параметры существенно изменяются на стадии средней бластулы. На графике (рис. 3-16) видно, что после двенадцатого цикла генерационное время резко возрастает. У *Xenopus laevis* время между двумя последовательными митозами, в течение первых 11-и циклов составляет немногим более 30 минут, но на 12-ом цикле оно достигает 70 минут и продолжает расти далее. Естественно, что в это время происходит падение прироста ДНК в единицу времени в расчете на одного зародыша. В это же самое время наблюдается изменение двигательной активности клеток. Если подвижность бластомеров до 11-го цикла выражается лишь в сокращениях кортекса, то в период 12-го цикла бластомеры приобретают способность к образованию псевдоподий и амебoidalной подвижности. Синтез РНК, о котором судили по включению радиоактивного уридинтрифосфата, у *X. laevis* в течение первых одиннадцати циклов очень слаб. Двенадцатый цикл характеризуется резким возрастанием включения этого предшественника РНК, что связано с началом массового синтеза малых ядерных РНК (так называемых «снурп'ов», snurp --- small *nuclear RNP*) и транспортной РНК. Чем объясняется это одновременное изменение таких разнородных параметров как синтез ДНК, частота клеточных делений, синтез РНК и клеточная подвижность? Поскольку аналогичное совокупное изменение ряда параметров происходит не только в целом зародыше, но и в изолированных бластомерах, логично предположение о существовании какого-то механизма клеточной природы, действующего одновременно во всех клетках зародыша и выполняющего функцию биологических часов.

Предположение о том, что в установлении этой ритмики играют роль деления дробления у *X. laevis* было отвергнуто опытами с цитохалазином, который подавлял цитотомию, но не влиял ни на синтез ДНК, ни на время активации процессов синтеза РНК. Как и в условиях нормального развития, изменения



параметров синтеза нуклеиновых кислот в опытах с цитохалазином наблюдались лишь через 6 часов после оплодотворения.

Время изменения свойств бластомеров *X. laevis* (так называемая *точка перехода на стадии средней бластулы* или МВТР, *mid blastula transition point*) не зависит от синтеза РНК. Если использовать ингибитор синтеза РНК аманитин на стадии средней бластулы, то синтез РНК подавляется на 80 --- 100%. Если же воздействовать аманитином на яйцо *Xenopus*, то дробление идет нормально и изменение его частоты происходит, как и в контроле, на 12-ом цикле.

Время наступления точки перехода на стадии бластулы не зависит и от числа прошедших раундов синтеза ДНК. Это было показано в эксперименте, в котором на яйцо накладывали лигатуру и после начала дробления в течение двух циклов одну половину яйца сохраняли безъядерной. Затем, ослабив лигатуру, пропускали ядро в недробившуюся половинку яйца. При этом оказалось, что точка перехода в этой половине наступала на два клеточных цикла позднее. Другими словами, в той половине, где дробление начиналось раньше, точка перехода приходилась на 12-ый цикл репликации, а в другой, где дробление задерживалось, на 14-ый цикл.

Из этих наблюдений следует, что критическим параметром, контролирующим время наступления точки перехода, может быть ядерно-цитоплазматическое отношение. В пользу такого предположения говорит и то, что точка перехода в гаплоидных яйцах наступает на один цикл позднее, тогда как при искусственно вызванной полиспермии, увеличивающей исходное количество ДНК примерно в 4 раза, начало активного синтеза РНК наблюдали на 2 цикла раньше. Связь между нормализацией ядерно-цитоплазматического отношения и началом транскрипционной активности развивающегося зародыша впервые была исследована известным московским эмбриологом А.~А.~Нейфахом (1925–1998).

Таким образом, наступление точки перехода на стадии средней бластулы у низших позвоночных животных определяется ядерно-цитоплазматическим отношением или, возможно, соотношением количества ДНК и цитоплазмы. Высказано предположение, что в яйце имеется равномерно распределенный

цитоплазматический компонент, который является ингибитором какой-то ключевой реакции, необходимой для активации таких разнородных функций, как синтез РНК, клеточное движение и событий клеточного цикла, и вместе с тем имеющий сродство к ДНК. Согласно этой гипотезе (гипотеза «истощения») каждое ядро связывает определенное количество ингибитора и образующиеся в ходе дробления ядра как бы «титруют» цитоплазму. При увеличении концентрации ДНК в зародыше, обусловленном отсутствием компенсаторного роста бластомеров, происходит падение концентрации ингибитора до некоего порогового значения, достижение которого и знаменует собой точку перехода МВТР.

Гипотеза истощения нашла свое подтверждение в опытах с инъекцией плазмиды с дрожжевым геном транспортной РНК в оплодотворенное яйцо *X. laevis*. В период дробления транскрипция инъекционной дрожжевой t-РНК прекращалась, что указывало на наличие ингибитора в цитоплазме ооцита. После прохождения МВТР синтез РНК восстанавливался. Если же в яйцо инъекцировали большие количества экзогенной ДНК, супрессия транскрипции не происходила, как предполагалось, из-за связывания ингибитора с избыточной экзогенной ДНК.

## ЛИТЕРАТУРА

Албертс~Б. и др. Рост и деление клеток. В книге: Молекулярная организация клеток, том 3. Изд. "Мир", М. Стр. 139 --- 200.

Албертс~Б. и др. Дробление и образование бластулы. В книге: Молекулярная организация клеток, том 4. Изд. "Мир", М. 1987. Стр. 54 --- 56.

Дондуа~А.~К. Сравнительно-эмбриологический очерк особенностей клеточных циклов в раннем развитии животных. В книге: Клеточное размножение и процессы дифференциации. Изд. "Наука", Л-д. 1983. Стр. 22 --- 54.

Дьюкар~Э. Межклеточные взаимодействия в период дробления. В книге: Клеточные взаимодействия в развитии животных. Изд. "Мир", М. 1978. Стр. 73 --- 91.

Епифанова~О.~И. Лекции о клеточном цикле. Изд. КМК Scientific Press. Москва. 1997. 144 стр.

Иванова-Казас~О.~М. Дробление яйца. В книге: Эволюционная эмбриология животных. "Наука", С-Пб. 1995. Стр. 42 --- 152.

Мюррей~Э., Киршнер~М. Чем регулируется клеточный цикл?/ "Мир" М.1991. В мире науки N5:24 --- 32.

## **е\_ ГЛАВА 4. ГАСТРУЛЯЦИЯ. ЗАРОДЫШЕВЫЕ ЛИСТКИ**

Стадия дробления завершается образованием многоклеточного зародыша. В конце дробления восстанавливается ядерно-цитоплазматическое отношение, характерное для соматических клеток. В это же время происходит изменение структуры клеточного цикла, появляются пресинтетическая и постсинтетическая фазы. Вступает в действие механизм, разрешающий деление лишь тем клеткам, масса которых достигает исходного уровня, и, следовательно, восстанавливается компенсаторный рост. В силу этих причин палинтомический цикл сменяется монотомическим.

В определенный момент развития (у позвоночных это точка перехода на стадии бластулы) клетки зародыша приобретают способность к двигательной активности. В жизни развивающегося организма начинается новый этап --- этап морфогенетических преобразований, характерной особенностью которого является становление пространственной организации зародыша.

Морфогенез зародыша обусловлен целым рядом скоординированных процессов, в том числе регулируемой клеточной пролиферацией, изменениями формы клеток и клеточными перемещениями. Морфогенетические движения обусловлены перемещениями как отдельных клеток (различного рода миграции), так и движением клеток в составе эпителиального пласта (эпителиальные морфогенезы). Одновременно с морфогенетическими событиями может происходить и спецификация клеток, в ходе которой инициируется возникновение разнообразных типов клеток, предназначенных для выполнения различных функций. Важно подчеркнуть, что цитодифференциация и морфогенетические движения имеют самостоятельные генетические системы контроля. Эти процессы вполне автономны, но, вместе с тем, они в каждом конкретном случае связаны между собой разнообразными механизмами сопряжения. Благодаря этому достигается высокая степень корреляции различных элементов морфогенеза и клеточной дифференциации.

К концу дробления у разных животных клетки зародыша могут находиться на разных этапах своей дифференциации. Они могут быть еще полностью

тотипотентными, способными при попадании в разные области зародыша, и, воспринимая разнородные сигналы, формировать различные зачатки. Они могут быть коммитированными к дифференциации в определенном направлении, но тем не менее способными при определенных условиях изменить направление своего развития. Спецификация клеток в этот ранний период развития может быть и достаточно жесткой, иногда необратимой. Практически у всех исследованных животных обнаружены клетки, получающие в процессе дробления цитоплазматические детерминирующие факторы ооцита. По завершении дробления эти клетки в ходе морфогенетических движений занимают строго определенные позиции.

Процесс первоначального морфогенетического преобразования бластулы, в ходе которого возникает пространственное обособление зачатков, дающих при дальнейшем развитии покровы, нервную ткань, пищеварительную систему, и --- у трехслойных животных --- мускулатуру и ткани внутренней среды, называется *гастроляцией* (от греч. γαστήρ --- желудок). У двухслойных животных речь идет о двух основных зачатках --- наружном и внутреннем. Наружный листок или *эктодерма* (от греч. εκτός --- вне, снаружи; δερμα --- кожа) является источником покровной и нервной ткани. Внутренний листок или *энтодерма* (греч. εντός--- внутри, в) дает пищеварительную систему. У трехслойных животных кроме этих двух зачатков имеется еще и третий --- средний листок, или *мезодерма* (греч. μέσος--- средний, находящийся в середине), которая образует мускулатуру, соединительную ткань, кровь, целомический эпителий, хрящевой и костный скелеты.

Гастроляция происходит у всех типов многоклеточных животных за исключением губок, у которых нет особой пищеварительной системы, образованной энтодермой (подробнее см. главу 6). По завершении гастроляции обычно образуются обособленные в пространстве клеточные территории --- *зародышевые листки*. Впервые зародышевые листки были описаны у позвоночных животных. К.~Бэр считал, что зародышевые листки --- универсальные структуры, которые возникают на ранних этапах эмбриогенеза всех *позвоночных* животных. Важным этапом развития учения о зародышевых листках было установление *принципа специфичности*, согласно которому

каждый листок у разных животных дает строго определенный круг производных. Позднее А.~О.~Ковалевский (1871) показал, что формирование зародышевых листков является общим свойством эмбрионального развития многоклеточных животных, включая беспозвоночных. Провозглашая идею единства происхождения многоклеточных, он постулировал гомологию зародышевых листков у представителей всех групп животных.

Впоследствии, в соответствии с биогенетическим законом Геккеля, утвердилось более чем спорное представление, согласно которому гомология зародышевых листков является следствием того, что они рекапитулируют *первичные органы* примитивных Metazoa. Привнесение “рекапитуляционного мотива” в теорию зародышевых листков завело эту теорию в тупик неразрешимых противоречий.

В основе формирования зародышевых листков лежат различные морфогенетические процессы, в том числе *иммиграция, эпиболия, деламинация и инвагинация* (рис. 4-1). Гастрюляция путем иммиграции обычна для Стрекающих, у которых клетки энтодермы возникают в результате выселения клеток из стенки бластулы внутрь зародыша. Если выселение носит повсеместный характер, говорят о *мультиполярной иммиграции*. Если же оно сосредоточено в одной области зародыша, ее называют *униполярной*. При гастрюляции путем деламинации элементы энтодермы образуются в результате направленного деления клеток бластулы, митотические веретена которых ориентированы перпендикулярно поверхности зародыша. *Морулярной деламинацией* называют образование энтодермы путем спецификации клеток, занимающих внутреннюю часть морулы. Гастрюляция может происходить и вследствие впячивания эпителиальной стенки бластулы, или инвагинации. Если внутренний энтодермальный слой образуется в результате обрастания поверхностными клетками, говорят об *эпиболии*. У Позвоночных при образовании зародышевых листков обычно имеется сложное сочетание разных типов клеточных движений.

Морфогенетические движения, которые обеспечивают гастрюляцию, имеют в своей основе различные и вполне устойчивые клеточные, молекулярные и генетические механизмы, которые активируются на стадии поздней бластулы.

Но если в основе морфогенетических процессов, связанных с образованием зародышевых листков у различных животных, лежат механизмы, которые контролируются разными генетическими системами управления, то становится очевидной бесперспективность идеи о том, что образование зародышевых листков у животных повторяет (рекапитулирует) процесс, происходивший у некой предковой формы. Признание в качестве примитивных Metazoa животных типа Фагоцителлы Мечникова является веским аргументом против утверждения рекапитуляционного принципа, как элемента теории зародышевых листков. Действительно, животные, у которых зародышевые листки образуются за счет инвагинации эпителиальной стенки бластулы, если что-либо и рекапитулируют, то, во всяком случае, не Фагоцителлу.

Представление о формировании зародышевых листков как своего рода рекапитуляции первичных органов примитивных предков вольно или невольно жестко связывает возникновение листков с клеточной дифференциацией. Однако анализ развития животных свидетельствует о том, что первичное предопределение судьбы клеток обычно связано не с гастрულიей. Первичная спецификация клеток зародыша часто происходит уже в период дробления, задолго до образования листков. Мы уже отмечали, что у многих животных имеет место телобластический принцип формирования зачатков. Бластомеры-зачатки описаны у гребневиков, аннелид, моллюсков, круглых червей, коловраток, асцидий и других животных с так называемым детерминативным развитием. Методами молекулярной биологии доказана ранняя спецификация бластомеров у иглокожих и амфибий.

Против представления о зародышевых листках, как своего рода рекапитуляции первичных органов Metazoa, говорит и часто обнаруживаемый сложный состав зародышевых листков. Например, в составе первичной кишки зародыша амфибий обнаруживается материал не только будущей энтодермы, но и клетки-предшественницы мезодермы.

По-видимому, нет и достаточных теоретических оснований для предположения, что спецификация клеток в раннем эмбриогенезе должна быть напрямую связана с морфогенетическими движениями. Наоборот, имеются

многочисленные данные, которые свидетельствуют о том, что спецификация клеток представляет самостоятельный класс явлений, и что она, не будучи жестко связанной с морфогенетическими движениями в раннем эмбриогенезе, может реализоваться как в период дробления, так и после него. Представление о первичной сопряженности формирования зародышевых листков и цитодифференциации --- ошибочно.

Наличие зародышевых листков в онтогенезе всех многоклеточных животных за исключением губок объясняется отнюдь не тем, что в онтогенезе этих животных происходит рекапитуляция процессов, характерных для некой анцестральной формы. Оно может быть понято с учетом того, что обособление клеток в виде зародышевых листков является важным элементом и универсальным инструментом формообразования. Гастрюляция не является каким-то уникальным и высоко специфическим морфогенетическим процессом. Характерные для гастрюляции перемещения клеточных пластов или миграции мезенхимы являются частным проявлением общего морфогенетического принципа. Перемещения пластов ни в коей мере не зависят от того, являются ли они гетерогенными, содержащими различные презумптивные зачатки, или же однородными, дифференцирующимися в ходе или после завершения гастрюляции.

Универсальные механизмы эпителиального формообразования, равно как и механизмы, обеспечивающие миграцию мезенхимы или эпиболию, при которой один слой клеток распространяется по поверхности другого слоя, возникли в эволюции независимо от гастрюляции. Разнообразные морфогенетические движения, которые обеспечивают гастрюляцию Двухслойных и Трехслойных животных, существовали уже у губок, у которых явление гастрюляции отсутствует. Нельзя не отметить, что у тех Стрекающих, у которых гастрюляция осуществляется путем иммиграции или деламинации, эпителиальный морфогенез с его инвагинациями и эвагинациями, широко используется при различных морфогенетических процессах на более продвинутых стадиях онтогенеза (Белоусов, 1987). Существование автономных механизмов эпителиального формообразования, закрепленных в виде особых генетических



программ, видимо, и лежит в основе независимого возникновения инвагинации в процессах гастрюляции в разных группах Metazoa (Беклемишев, 1964).

Теория зародышевых листков постулировала принцип специфичности (рис. 4-2), подчеркивающий, что у животных, занимающих различное положение на филогенетическом древе, имеется вполне определенный и сходный круг производных эктодермы, мезодермы и энтодермы. Эта закономерность развития листков, возможно, служит указанием на существование неких «троп дифференциации», предпочтительных путей последовательного включения генетических программ, контролирующих спецификацию, детерминацию и дифференциацию (рис. 4-3). Очевидно, что предпочтительные пути, тем не менее, не являются единственно возможными, поскольку принцип специфичности листков далеко не абсолютен и широко известны многочисленные исключения из этого правила.

Конкретные механизмы гастрюляции разнообразны. Они будут рассмотрены в главах, посвященных очерку сравнительной эмбриологии животных.

## ЛИТЕРАТУРА

Дондуа А. К. Теория зародышевых листков: дискуссионные аспекты// Онтогенез. 1994. Т. 25. №6. Стр. 68 - 76.

Иванова-Казас О.М. Зародышевые листки и гастрюляция. В книге "Эволюционная эмбриология животных". Изд. Наука. Санкт-Петербург. 1995. Стр. 153 - 264.

Иванова-Казас О. М., Кричинская Е. Б. Курс сравнительной эмбриологии беспозвоночных животных. Изд. Ленинградского ун-та. 1988. Разделы Онтогенез Многоклеточных животных и Теория зародышевых листков. Стр. 27-53.

## ГЛАВА 5. ЛИЧИНОЧНОЕ РАЗВИТИЕ. МЕТАМОРФОЗ.

Ранний онтогенез подразделяют на эмбриональный и постэмбриональный периоды. Эмбриональным периодом принято называть отрезок времени от начала развития до рождения или до момента выхода из яйцевых оболочек. В конце эмбрионального периода развивающийся индивидуум может иметь план строения, характерный для взрослой формы, но может и существенно отличаться от него по целому ряду важных параметров. В первом случае говорят о животных *с прямым развитием*, у которых в результате эмбрионального развития возникает *ювенильная* форма (от лат. juvenis --- молодой). Ювенильное животное отличается от взрослой формы неполным развитием, в том числе, неполным развитием половой системы, меньшими размерами, иными пропорциями и некоторыми второстепенными чертами (рис. 5-1). Во втором случае речь идет о животных *с непрямым или личиночным развитием*. Личинка --- стадия развития, на которой животное, не достигнув дефинитивного плана строения, характерного для половозрелой формы, обнаруживает, тем не менее, способность к активному движению и, часто, к самостоятельному питанию. Личинки обычно имеют специализированные органы движения, достаточно развитую нервную систему и органы чувств, дифференцированную пищеварительную систему. План строения личинки может резко отличаться от плана строения тела взрослого организма (рис. 5-2). Как правило, у личинок отсутствует половая система. Исключение представляют лишь неотенические личинки (см. ниже).

Происхождение личиночной стадии является предметом оживленной дискуссии зоологов. Очевидно, что личиночная стадия возникала в развитии животных неоднократно. Можно представить себе разные способы образования личиночной стадии в онтогенезе.

Можно допустить, например, что личинка современного животного является видоизмененной дефинитивной формой предка. В этом случае личиночная стадия соответствует взрослой предковой форме, давшей начало современному животному путем надстройки анцестрального онтогенеза (рис. 5-3). Это

допущение предполагает, что репродуктивная функция при этом смещается на стадии, которые возникли в результате указанной надстройки. Такого рода личинки, исходно существовавшие как взрослые форм анцестральных животных, можно назвать *первичными*. Во избежание недоразумения надо иметь в виду, что в научной литературе первичными называют также и личинок животных, в отношении которых предполагается, что их онтогенез исходно характеризовался непрямым развитием. Нельзя не заметить, что сторонники имманентности личиночной стадии обходят вопрос о механизмах возникновения онтогенеза, в ходе которого происходит замена одного плана строения организма другим. Мы в дальнейшем *первичными* будем называть личинки, возникшие предположительно в результате трансформации взрослых предковых форм каких-то древних микроскопических животных.

Личиночная стадия может возникнуть и как вставочная фаза в онтогенезе, имевшем ранее установку на развитие дефинитивной формы (рис. 5-4). Адаптивное значение такой вставки, по-видимому, состоит в разделении фазы репродукции, свойственной половозрелой форме, и фазы накопления энергетических ресурсов, которое становится теперь прерогативой, главным образом, личинки. Появление личиночной фазы может расширить ареал обитания вида за счет освоения личинкой дополнительных экологических ниш. Подобного рода личинки, возникающие в результате видоизменения первоначального паттерна прямого развития, будем называть *вторичными*. У вторичных личинок часто имеются высокоспециализированные органы, характерные только для этой стадии онтогенеза.

Вопрос о первичности или вторичности личинок не прост для решения. Вторичность личиночной стадии морских беспозвоночных признавалась многими выдающимися эмбриологами 20-го столетия (П.~П.~Иванов, 1937; Г.~А.~Шмидт, 1951; Н.~А.~Ливанов, 1955). Достаточно основательной представляется идея о вторичности личинок Губок и Книдарий (А.~В.~Ересковский, 2001), хотя, в настоящее время, нельзя исключить и иную точку зрения. Согласно О.~М.~Ивановой-Казас (1995), К.~Нильсену (Nielsen, 1998), предки древних Metazoa вели пелагический образ жизни. Впоследствии, в силу надстройки онтогенеза, они освоили новую экологическую нишу ---

бенталь, и дали формы, которые имели пелаго-бентический жизненный цикл. При этом прежняя дефинитивная форма сохранилась в виде пелагической личинки. С этой точки зрения, развитие низших Metazoa с личинкой имеет первичный характер. Разнообразие форм пелагических личинок, отражающее эволюцию предковых дефинитивных форм животных, представлено на рис. 5-5.

Проблема возникновения личиночной стадии в онтогенезе в последние годы приобрела особую актуальность в связи с развернувшимися исследованиями генетических механизмов индивидуального развития низших билатеральных животных и попытками осмыслить филогенез многоклеточных с учетом данных об эволюции их генома. Так, Эрик Дэвидсон и соавторы (Cameron, Peterson, Davidson, 1998; Peterson, Davidson, 2000) полагают, что для большинства видов билатеральных морских беспозвоночных характерны первичные личинки. Согласно их взглядам, уже задолго до Кембрия существовали морские животные, которые были похожи на личинок современных видов с непрямим развитием. Также как и современные личинки, они имели микроскопические размеры (меньше 1 мм), и состояли всего из нескольких тысяч клеток, представленных весьма ограниченным числом разновидностей.

Дэвидсон и соавторы считают, что общий предок билатеральных животных должен был иметь аналогичную стадию онтогенеза. Эта стадия, как у анцестральных форм, так и у современных животных, достигается в результате эмбриогенеза «примитивного типа» (Davidson, 1991). Примитивный тип эмбриогенеза, по Дэвидсону, отличается тем, что в период дробления, которое характеризуется строго определенным и неизменным для данного вида положением бластомеров в пространстве, образуются клетки-основательницы нескольких клеточных линий, каждая из которых экспрессирует специфические гены и формирует различные части зародыша. Эмбриогенез завершается спустя 8 --- 12 клеточных циклов. Спецификация клеток-основательниц может быть автономной, определяемой цитоплазматическими детерминантами яйца, или зависимой, требующей межклеточных взаимодействий. Крупномасштабные перемещения эмбриональных клеток у этих животных происходят только после спецификации клеток. По Дэвидсону, при примитивном типе развития

отсутствует период транскрипционного покоя, и зиготическая транскрипция в этом случае осуществляется уже на стадии дробления.

На основании сравнительного исследования генетических систем контроля раннего эмбриогенеза Дэвидсон высказывает предположение, что эти системы должны были существовать уже у предков современных билатеральных животных. По Дэвидсону, первичные билатеральные напоминали личиночные формы современных морских беспозвоночных с непрямым развитием. По его мнению, анцестральные формы отличались от современных личинок тем, что они должны были генерировать половые клетки --- яйца и спермии. Надстройка онтогенеза и появление новых форм животных, характерных для современной фауны Metazoa, стали возможными благодаря появлению у предковых форм особой популяции резервных клеток ("set-aside cells"), которые на начальных этапах онтогенеза не дифференцировались. Пролиферация и спецификация этих резервных клеток подпадала под действие вновь возникавших генетических систем управления. Можно предположить, что подобные резервные клеточные популяции могли формироваться, например, в результате временной блокировки дифференциации первичных половых клеток. Исходно такая отсрочка могла создавать некоторые преимущества, поскольку она способствовала накоплению энергетических ресурсов, необходимых для гаметогенеза. Не являются ли открытые недавно белки полярных гранул, блокирующие процессы транскрипции в первичных половых клетках ряда беспозвоночных, отзвуком этих событий далекого прошлого?

В природе наблюдается обратная зависимость между числом производимых ооцитов и количеством запасенного в них желтка. Многие животные производят огромное количество яиц относительно бедных желтком. Так, самки некоторых морских ежей за год продуцируют примерно 400 млн. яиц. Запасов питательных веществ в яйце часто хватает лишь для формирования очень просто устроенной личинки. В этих случаях именно активное питание создает предпосылки для постепенного усложнения личинки. В онтогенезе многих животных наблюдается последовательный ряд сменяющих друг друга форм личинок. Наиболее продвинутые в развитии личинки превращаются в ювенильные формы животных. Например, у полихет в результате спирального

дробления образуется личинка – трохофора, которая сегментируется и становится метатрохофорой. В ходе дифференциации метатрохофора приобретает червеобразный вид и превращается в нектохету, ювенильную форму червя. За счет пролиферативной активности в зоне роста нектохеты и сегментации растущего тела происходит многократное увеличение размеров животного, которое постепенно приобретает дефинитивные черты.

Функции, выполняемые личинками, разнообразны. Одна из функций состоит в обеспечении последующего развития энергией. Среди пелагических личинок беспозвоночных животных различают лецитотрофные и планктотрофные формы. Энергетическим ресурсом *лецитотрофных* личинок (от греч. NB lekithos --- яичный желток; трофоζ --- кормилец) служит желток, запасенный в яйце. *Планктотрофные* личинки питаются, поглощая главным образом фитопланктон. У планктотрофных личинок имеются особые личиночные органы --- ресничные кольца (трохофора) или ресничные шнуры (диплеурула), с помощью которых пищевые частицы направляются в область ротового отверстия. Питание личинок может происходить и за счет поглощения растворимых предшественников макромолекул из морской воды непосредственно тканями личинки (Дондуа, Федорова, 1986; Jackle, 1995).

Наличие планктотрофной личинки и возможность раннего перехода на активное питание позволяет обойтись минимальными запасами желтка в яйце, что особенно важно при отсутствии у животного специализированных гонад. Стратегия развития, направленная на скорейшее включение механизма активного питания, позволяет формировать большое количество яиц с умеренными запасами желтка и других энергоемких веществ и органелл. У лецитотрофных личинок формирование пищеварительной системы, напротив, может запаздывать. Так, у бластулоподобных личинок, паренхимул и планул низших Metazoa оформленная пищеварительная система отсутствует.

Важной функцией личинок является расселение особей по ареалу, а также (у бентосных форм) --- выбор субстратов, подходящих для дальнейшего развития. Адаптивный характер распространения личинок за пределы ареала, занимаемого родительскими организмами, обусловлен и тем, что расселение

создает предпосылки для генетического взаимодействия с представителями других популяций, и интенсифицирует, таким образом, процесс формирования генетического разнообразия. Реализация этой функции становится возможной благодаря возникновению разнообразных органов движения, развитию элементов нервной системы и формированию специализированных клеток или органов, обеспечивающих прикрепление личинки к субстрату.

У многих паразитических животных личинка осуществляет выбор хозяина. Личинка моногенетических сосальщиков --- *онкомирацидий* --- снабжена ресничными поясами, обеспечивающими двигательную активность (рис. 5-6). Онкомирацидий имеет мозг, глаза, кишечник, протонефридии. С помощью прикрепительного аппарата, несущего разнообразные крючки, плавающий мирацидий закрепляется на поверхности тела головастика, а позднее --- претерпевает метаморфоз и проникает в ткани хозяина (рис. 5-7). У дигенетических сосальщиков имеется сложный жизненный цикл, в ходе которого образуются разные формы личинок, обеспечивающих смену хозяев. Из попавшего в водную среду яйца образуется ресничная личинка --- *мирацидий* (от греч.  $\mu\epsilon\tau\rho\alpha\kappa\iota\omega\delta\eta\zeta$  --- детский). На переднем конце личинки располагается хоботок со стилетом, глазки и нервный ганглий. Мирацидий проникает в промежуточного хозяина (обычно моллюски) и превращается в *спороцисту*, у которой органы мирацидия редуцируются. Особые генеративные клетки спороцисты дают начало новому партеногенетическому поколению *редиям* (по имени Ф. Реди), которые остаются в первичном хозяине и за счет своих генеративных клеток образуют новое личиночное поколение --- *церкарии* (от греч.  $\kappa\epsilon\rho\kappa\omicron\zeta$  --- хвост). Церкарии имеют характерный хвостовой придаток, две присоски, иногда стилет и глазки (рис. 5-8). Церкарии покидают первичного хозяина, и, после периода свободной жизни в водной среде, проникают в ткани вторичного промежуточного хозяина, в тканях которого и проходят очередной метаморфоз. При поедании промежуточного хозяина личинка паразитического червя попадает в пищеварительный тракт окончательного хозяина, где и превращается в дефинитивное половозрелое животное.

Превращение личинки во взрослую форму, или метаморфоз (от греч.  $\mu\epsilon\tau\alpha\mu\omicron\rho\phi\omega$  --- преобразовать, превращать в другой вид) предполагает замену

дифференцированных личиночных структур дефинитивными. Личиночные органы обычно подвергаются разрушению. Клеточный материал при этом утилизируется, или же, если специализация не зашла слишком далеко, дедифференцируется и используется вновь при образовании дефинитивной формы животного. В некоторых случаях при метаморфозе происходит отторжение личиночных структур. Например, у немертин из отряда *Heteronemertini* имеет место *некротический метаморфоз* (рис. 5-9). У этих животных дефинитивное тело образуется за счет особых эктодермальных впячиваний --- имагинальных дисков, которые погружаются внутрь личинки и, срастаясь между собой, формируют новый дефинитивный кожный покров. Молодая немертина, сформировавшаяся внутри пилидия, покидает покровы личинки и съедает их. Глубина метаморфоза зависит от уровня специализации личиночных тканей и органов: чем более специализированный вид имеет личинка, тем более глубокие преобразования происходят при ее превращении.

У ряда животных личинки обладают способностью к бесполому размножению (например, у некоторых мшанок, асцидий, иглокожих). Известна также способность некоторых личинок и к половому размножению. В этом случае у личинок формируется половая система, подобная половой системе взрослых животных, что можно рассматривать как проявление своеобразной гетерохронии. При этом различают *прогенез* или раннее развитие половых продуктов до достижения взрослой стадии, и *неотению*, или задержку развития соматических органов. Широко известна неотения амбистом, хвостатых амфибий, имеющих половозрелых личинок --- аксолотлей. Задержка развития соматической сферы взрослых животных у амбистом связана с пониженной функцией щитовидной железы. Популяции аксолотлей могут поддерживать свое существование без достижения конечной фазы развития.

## ЛИТЕРАТУРА

Иванова-Казас~О.~М. Постэмбриональное развитие, личинки и метаморфоз. (Глава 6 в книге: Эволюционная эмбриология животных. Изд."Наука", Санкт-Петербург, 1995). Стр.296 - 439.



Nielsen~C. Origin and evolution of animal life cycles. *Biol., Rev.*, 73:125 - 155.1998.

Peterson~K.~J., Davidson~E.~H. Regulatory evolution and the origin of the bilaterians. 2000.

## ЧАСТЬ 1. ОСНОВНЫЕ ТИПЫ РАЗВИТИЯ ЖИВОТНЫХ

Знакомство с конкретными формами развития животных обнаруживает их огромное разнообразие. Различия касаются даже самых ранних этапов развития --- дробления, первичной дифференциации зародыша, закладки осей животного, не говоря уже о более поздних стадиях, когда осуществляется органогенез. Развитие, как мы видели, может быть *прямым*, и в этом случае план строения тела взрослого животного закладывается уже непосредственно в эмбриональном периоде. Другой характер имеет *непрямое развитие*, при котором сначала в эмбриогенезе формируется личинка, которая затем, в ходе *метаморфоза*, путем сложных морфогенетических перестроек преобразуется в дефинитивную форму. Тем не менее, разнообразие форм развития может быть сведено к нескольким типам. Очевидно, что классификация типов развития во многом зависит от субъективной оценки ее автором значения тех или иных элементов эмбриогенеза.

В первой половине XIX столетия К.~Ф.~Бэр на основании имевшихся в его распоряжении сравнительно скудных данных о развитии разных видов животных сделал вывод о наличии четырех основных планов развития, каждый из которых соответствует тому или иному типу организации животных (1828, 1837). Ведущей характеристикой типа развития, по К.~Ф.~Бэру, служит тип симметрии формирующегося зародыша. Бэр полагал, что выделенные им типы животных эволюционно между собой не связаны, но допускал, что в пределах типа возможна эволюция от низших форм к высшим.

Современный классик сравнительной и эволюционной эмбриологии О.~М.~Иванова-Казас насчитывает восемнадцать типов развития. Под типом развития О.~М.~Иванова-Казас понимает *сложившийся в ходе эволюционного развития комплекс взаимосвязанных морфогенетических процессов, как очень древних, унаследованных от отдаленных предков, так и возникших в более позднее время*. В пределах типа развития, по О.~М.~Ивановой-Казас, имеются варианты, которые обусловлены условиями существования, а также стратегией размножения. По мнению О.~М.~Ивановой-Казас, особенности каждого нового типа развития определяются неким ведущим онтогенетическим

процессом, выяснение природы которого и составляет одну из задач эволюционной эмбриологии (Иванова-Казас, 1995).

Тип развития той или иной группы животных формируется в процессе эволюции и определенным образом связан с филогенезом этой группы. Эта связь иногда очевидна, но, как мы увидим при рассмотрении конкретного материала, животные, принадлежащие к одному монофилетическому типу, могут и заметно различаться по целому ряду важных параметров индивидуального развития.

Современная филогенетика при установлении родства различных классов и типов животных решающее значение придает данным молекулярной биологии о сходстве и различиях нуклеотидных последовательностей ДНК различных генов у представителей различных групп многоклеточных, например, гена 18S рРНК или кластерных Нох-генов. Согласно этим данным, современные Metazoa представлены пятью основными группами (рис. 6-0). Одну из наиболее обособленных и древних групп представляют Губки (Porifera). Другую группу образуют --- двухслойные животные (Diploblastica), в состав которых входят Placozoa, Cnidaria и Stenophora. Следующие три группы характеризуются трехслойностью и билатеральностью (Triploblastica или Bilateria). Это, во-первых, Ecdysozoa, включающие Приапулид, Нематод и Членистоногих; во-вторых, Lophotrochozoa, объединяющие Моллюсков, Червей, Брахиопод, Мшанок, Форонид и Плоских червей, и, наконец, Deuterostomia или Вторичноротые, в составе которых находятся следующие типы: Иголокожие, Полухордовые, Первичнохордовые, Головохордовые и Хордовые. Все эти группы имеют свои специфические особенности раннего развития. Так, для Вторичноротых характерно образование трех зародышевых листков и закладка ротового отверстия независимо от бластопора (первичного рта), возникающего в процессе гастрюляции. У Ecdysozoa и Lophotrochozoa также имеются эктодермальные, мезодермальные и энтодермальные производные, но эти группы относятся к первичноротым животным, у которых рот возникает в связи с бластопором.

Стрекающие (Cnidaria) --- животные с двумя листками: эктодермой и энтодермой. В онтогенезе Губок дифференциация клеточных элементов отличается большим своеобразием: у них нет энтодермы, а следовательно, нет

и зародышевых листков, хотя некоторые исследователи, стремясь подчеркнуть единство всех Metazoa, ошибочно сближают Губок с двухслойными животными.

В пределах данной книги нет необходимости, да и возможности, описать все многочисленные типы развития, присущие современным многоклеточным животным. Мы ограничимся самой общей характеристикой развития лишь некоторых основных типов. При этом с учетом общей задачи учебника, предпочтение будет отдано тем группам, представители которых стали модельными объектами биологии развития.

За последние двадцать лет наблюдается возрождение глубокого интереса к проблемам эволюционной эмбриологии. Стало очевидным потенциальное значение современной биологии развития для решения общих проблем эволюционной биологии. Исследование молекулярно-генетических механизмов эмбрионального развития обнаружило своеобразный парадокс, суть которого состоит в том, что все многообразие форм развития животных, принадлежащих к морфологически различным типам, часто контролируется и направляется генами, структура которых в высшей степени консервативна. Современная биология развития подошла к очень важному вопросу о закономерностях эволюции генетических механизмов развития. Раздел биологии развития, который исследует эту проблему, называют эволюционной биологией развития. Очевидно, что вопрос о том, как эволюция молекулярно-генетических систем, контролирующих индивидуальное развитие, преобразуется в эволюционные изменения морфологии животных, является ключевым для понимания проблем макроэволюции, т.е. имеет общебиологическое значение.

В самом общем виде можно сказать, что в основе эволюции форм лежит возникновение новых программ развития. Суть этих изменений состоит в мутационном, наследуемом изменении многоступенчатой генетической программы, которая обеспечивает формирование определенного фенотипа. Если естественный отбор сохраняет видоизмененный фенотип, сохраняется и новая программа развития. Если внутривидовые эволюционные изменения морфологии требуют, по крайней мере, трех событий --- мутации,

репрограммирования и отбора, то эволюция, выходящая за пределы вида, нуждается, кроме того, и в репродуктивной изоляции (W.~Arthur, 2002).

В первом томе учебника основное внимание обращено на морфологическую характеристику разных типов развития. В отдельных случаях делается попытка оценить возможное значение видоизменений онтогенетических путей становления фенотипа для процессов макроэволюции. Более глубокое рассмотрение проблем эволюционной биологии развития возможно после ознакомления с основными механизмами генетического контроля над развитием и их эволюцией, представленными во втором томе.

## ГЛАВА 6. ГУБКИ (PORIFERA)

Губки --- древнейшая группа многоклеточных животных, возникшая не позже 600 млн. лет тому назад, в докембрии. Они образуют изолированную ветвь наиболее просто организованных Metazoa, что предопределяет и своеобразие их эмбрионального развития. В настоящее время науке известны около 9000 видов губок, которые объединяются в три основные класса, различающиеся, прежде всего, строением своего скелета. У Известковых губок (Calcispongiae) скелет построен из кальцита. Стекланные губки (Hexactinellida) имеют шестилучевые кремневые иглы, а Обыкновенные губки (Demospongiae) характеризуются наличием четырехлучевых и одноосных кремневых игл. К Demospongiae относятся и Роговые губки.

Примитивность организации губок проявляется как на анатомическом, так и на гистологическом уровнях. Тканевые элементы у губок не всегда строго детерминированы, и, часто, обладают способностью к взаимным превращениям. У губок нет энтодермы. Отсутствует нервная и мышечная системы, хотя у некоторых губок имеются миоциты, обеспечивающие сокращения оскулюма. Среди тканевых элементов губок различают *пинакодерму* --- плоский эпителий поверхности тела и каналов водоносной системы, представленный уплощенными или грибовидными *пинакоцитами*, и *хоанодерму*, состоящую из воротничковых жгутиковых клеток или *хоаноцитов*, образующих жгутиковые каналы и жгутиковые камеры (рис. 6-1). Между пинакодермой и хоанодермой расположен *мезохил* (*мезоглея*). В

мезоглее встречаются звездчатые клетки, секретирующие коллаген, --- колленциты; клетки, участвующие в формировании скелета: органического --- спонгоциты и неорганического --- склероциты, а также блуждающие амебоциты. У Демоспонгий среди амебоцитов различают тотипотентные клетки --- археоциты, способные дать начало всем типам клеток, в том числе и половым (рис. 6-2). У Известковых губок тотипотентными клетками являются хоаноциты.

Примитивность губок выражается в отсутствии гонад и половых протоков. Во время сперматогенеза у представителей Demospongia формируются временные сферические образования, ограниченные уплощенными соматическими клетками, или сперматоциты, в которых происходит сперматогенез. У Calcispongiae сперматозоиды одиночные. Женские половые клетки обычно разбросаны в мезохиле, иногда они образуют небольшие скопления. Среди губок имеются как раздельнополые (гонохористы), так и гермафродитные виды. Ооциты на ранних этапах оогенеза имеют вид амебоидных клеток и принимают характерную сферическую форму лишь по мере роста и накопления желточных гранул. Доставка питательных веществ и органелл в ооциты происходит различными способами (рис. 6-3). Во-первых, транспорт веществ может происходить через плазматическую мембрану ооцита, в частности, путем пиноцитоза (рис. 6-3, А); во-вторых, у ряда губок, по-видимому, происходит перемещение содержимого особых питающих клеток в ооцит по цитоплазматическим мостикам (рис. 6-3, Б); в-третьих, описано поглощение ооцитами амебоцитов мезохила (рис. 6-3, В). Наконец, у ряда губок имеется эндогенное желткообразование. Своеобразная стратегия снабжения будущего зародыша питательными веществами у некоторых губок состоит в том, что вспомогательные клетки образуют своего рода ассоциацию с ооцитом, и их содержимое используется уже в ходе эмбриогенеза (рис. 6-3, Г). В период вителлогенеза ооциты достигают своих дефинитивных размеров, которые у разных видов варьируют от 40 до 500~ мкм. Принято считать, что ооциты губок не имеют яйцевых оболочек, хотя, по крайней мере, у одного вида (*Tetilia japonica*) недавно была описана типичная желточная оболочка.

У некоторых губок оплодотворение происходит во внешней среде, куда половые клетки выводятся через оскулюм животного. Чаще, однако, эмбриональное развитие идет в тканях материнского организма.

Эмбриональное развитие живородящих губок происходит в особых капсулах -- *фолликулах*, формирующихся в конце вителлогенеза уплощенными соматическими клетками различной природы.

У всех изученных до настоящего времени видов губок дробление полное. Оно может быть равномерным и --- реже --- неравномерным. Процесс дробления завершается образованием бластулы.

У известковых губок подкласса *Calcinea* и, возможно, некоторых демоспонгий бластула имеет выраженную полость и называется *целобластулой* (от греч. 111111 --- имеющий полость; 9191111 --- зародыш) (рис.6-4, А). Иной характер строения имеет личинка *Calcinea кальцибластула*. Клетки кальцибластулы имеют жгутики, обеспечивающие ее подвижность. Благодаря ингрессии клеток полость кальцибластулы заполняется клетками (рис.6-4, Б). На этой стадии личинка прикрепляется к субстрату и расплывается по нему (рис.6-4, В). Между периферическими клетками и внутренней клеточной массой возникают лакуны. При этом находящиеся на поверхности клетки уплощаются и дифференцируются как пинакоциты, а внутренние --- дают начало хоаноцитам и склеробластам. Предполагается, что клетки прикрепившейся личинки еще не коммитированы, и дифференцируются в соответствии с занимаемым положением.

У известковых губок из подкласса *Calcaronea* развитие идет иным путем (рис. 6-5). У них дробление завершается образованием бластулы, уже состоящей из двух типов клеток --- микромеров, которые формируют жгутики, и зернистых макромеров. При этом на стадии ранней бластулы (*стомобластула*, от греч. 11119 --- рот; 9191111 --- зародыш) между макромерами остается отверстие --- *фиалопор* (от греч. 11911 --- чаша; 11111 --- проход). Микромеры имеют жгутики, обращенные внутрь полости бластулы (рис. 6-5, А). На следующем этапе благодаря согласованной амебоидной активности клеток материнского организма и зернистых клеток зародыша происходит выворачивание бластулы через фиалопор, так называемая *инверсия бластулы* или *экскурвация* (рис. 6-5, Б). В результате этого процесса образуется *амфибластула* (от греч. 9111 --- с двух сторон; 9191111 --- зародыш), состоящая из двух по-разному дифференцированных областей. Передняя область образована столбчатыми клетками со жгутиками, обращенными во внешнюю среду, а задняя ---

крупными округлыми гранулярными клетками (рис. 6-5, В). Амфибластула прикрепляется к субстрату передним концом, клетки которого теряют свои жгутики, и приобретает вид уплощенного диска. Из зернистых клеток задней области личинки образуются пинакоциты. Клетки внутренней массы, которые возникают из погружающихся внутрь клеток переднего конца, дифференцируются на периферические и центральные клетки. Последние дают хоанодерму. Периферические клетки внутренней массы образуют мезохил с характерными для него элементами --- склеробластами и спикулами. После формирования пор и оскулума возникает трубкообразная молодая губка --- *олинтус* (от греч. 1111111 --- незрелый инжир).

У многих *Demospongia* (рис. 6-6) в результате неупорядоченного хаотического дробления формируется *стерробластула* (от греч. 1111111 --- плотный; 9191111 --- зародыш), или *морула* (рис.6-6, А). В дальнейшем она трансформируется в удлиненную вдоль переднезадней оси личинку --- *паренхимулу*, покрытую жгутиковыми клетками. Иногда на заднем полюсе или на обоих концах личинки жгутиковые клетки отсутствуют (рис.6-6, Б). Внутри личинки дифференцируются амебоциты, а также иные типы клеток, характерные для взрослых особей, в том числе секреторные клетки и склеробласты, образующие спикулы скелета. У личинок пресноводных губок (бадяг) имеются хоаноциты, которые уже на этой стадии могут формировать хоаноцитные камеры (6-6, В). Паренхимулы прикрепляются к субстрату передним полюсом. Основную морфогенетическую роль при метаморфозе паренхимулы играют внутренние клетки личинки – личиночные археоциты. Часть этих клеток мигрирует на поверхность личинки, дифференцируясь в пинакоциты. Архециты, оставшиеся внутри развивающегося животного, дают начало склеробластам и другим элементам мезохила. Покровные, жгутиковые и безжгутиковые клетки личинки оказываются внутри формирующейся *куколки* (рис.6-6, Г). Судьба жгутиковых клеток личинки может быть, по-видимому, различной. У одних видов, они подвергаются апоптозу, у других --- частично превращаются в хоаноциты, у третьих --- дифференцируются и как хоаноциты, и как клетки мезохила. После формирования функционирующей водоносной системы молодая однооскулумная губка Демоспонгий носит название *рагон*.

Следует заметить, что без проведения специальных исследований с применением надежных маркеров, позволяющих следить за перемещением и



трансформациями клеток, было бы опрометчиво делать какие-либо окончательные выводы о детерминации клеток на ранних этапах развития губок. Немногочисленные экспериментальные исследования свидетельствуют о том, что проблема формирования клеточных линий в онтогенезе губок сложнее, чем это кажется на первый взгляд. Действительно, при разрезании амфибластулы губки *Sycon* на переднюю (жгутиковую) и заднюю части из передней области возникали бластулообразные личинки, которые далее не дифференцировались, тогда как зернистые клетки заднего отдела обнаруживали тотипотентность и давали все элементы взрослой губки. У других видов раздельное культивирование жгутиковых клеток и клеток внутренней массы паренхимулы показало, что хоаноциты развиваются в обоих случаях. В опытах с мечением радиоактивным йодом поверхностных клеток личинки *Microciona prolifera* было установлено, что эти клетки погружаются во внутреннюю массу, где их фагоцитируют амебоциты, тогда как хоаноциты возникают из клеток внутренней массы. По-видимому, в онтогенезе губок хоаноциты могут возникать из разных источников, в том числе и из археоцитов. Так или иначе, имеющиеся данные по раннему развитию не дают оснований говорить о наличии у губок зародышевых листков, как особых клеточных популяций, дающих начало определенным тканевым образованиям, которые можно было бы назвать эктодермой или энтодермой.

Наиболее продвинутым в эволюционном отношении следует считать развитие *Nomoscleromorpha*, выделяемых ныне в ранг отдельного класса (А. В. Ересковский, 2002). При анатомической простоте организации, только эта группа губок имеет настоящую базальную мембрану, в состав которой входят тенасцин, ламинин и коллаген типа IV (Humbert-David, Garrone, 1993; Boute et al., 1996), т. е. обладает признаками истинных тканей Eumetazoa. Базальная мембрана подстилает хоанодерму и пинакодерму губки, а в период размножения она подстилает также сперматоцисту, фолликул яйца и зародыша. Базальная мембрана характерна также и для жгутикового эпителия личинок этих губок (Boury-Esnault, et al., 2003).

Для развития *Nomoscleromorpha* характерны следующие основные особенности. Сперматозоиды имеют акросому. Дробление полное равномерное, неупорядоченное, приводящее к формированию равномерной неполяризованной морулы (рис. 6-7, А). В результате своеобразной

мультиполярной эмиграции, в ходе которой происходит центробежный выход клеток морулы на периферию, образуется целобластула (рис. 6-7, Б) (Ereskovsky, Boury-Esnault, 2002). В конце стадии формирования личинки проявляется переднезадняя полярность. Личинка *цинктобластула* (от лат. *cinctus* --- опоясанный) состоит из однослойного жгутикового эпителия, ограничивающего обширную центральную полость (рис. 6-7, В). Для цинктобластулы характерен пояс жгутиковых клеток с внутриядерными кристаллоидами. Личинки *Nomoscleromorpha* имеют уникальный для губок ресничный эпителий эуметазойного типа с базальной мембраной и опоясывающими десмосомами. При метаморфозе цинктобластул происходит инвагинация переднего полушария, и формируются карманообразные впячивания жгутикового слоя, которые позднее образуют хоаноцитные камеры (рис. 6-7, Г). Другими словами, воротничковые клетки губки образуются путем прямой трансформации ресничных клеток личинки. Клетки мезохила формируются в результате дедифференциации жгутиковых клеток, которые выселяются из эпителия личинки. При метаморфозе переднезадняя ось личинки становится апикобазальной осью губки.

Губкам присуще бесполое размножение, разные формы которого представлены на рис.6-8. При *фрагментации* отламывающиеся под механическим воздействием кусочки губок проявляют способность к заживлению раны и ограниченной регенерации. Широко распространено у губок *латеральное почкование*, в ходе которого развитие новой особи происходит на боковой поверхности тела материнской губки. Для почек обычно характерна присущая губкам пространственная организация, хотя нередко они утрачивают исходную полярность и образованы скоплением недифференцированных элементов --- *археоцитов*, которые после отделения почки от материнской особи вместе со склеробластами формируют новую губку.

Особый интерес представляет *геммулогенез*, в ходе которого образуется огромное число *геммул* (от лат. *gemmula* --- маленькая почка), особых репродуктивных тел, возникающих путем агрегации полипотентных клеток. Образование геммулы --- достаточно сложный морфогенетический процесс, который начинается с агрегации клеток мезохила --- археоцитов, трофоцитов, особых склероцитов и спонгоцитов. Археоциты фагоцитируют питающие клетки, интенсивно растут и накапливают значительные массы разного рода

включений, которые иногда называют «ложным желтком». Такие архециты называют *тезоцитами* (от греч.  $\tau\epsilon\sigma\iota\tau\eta$  --- установка, закладка). На поверхности скопления тезоцитов обычные архециты формируют плоский эпителий --- временный покров. Под этим покровом спонгоциты образуют столбчатый эпителий, и секретируют капсулу геммулы. В области микропиле, через которое впоследствии происходит выход молодой губки, капсула относительно тонка. Склероциты доставляют в геммулу особые скелетные элементы --- *амфидиски*, которые встраиваются между спонгоцитами и включаются в состав капсулы. После диапаузы, которая продолжается в течение периода, неблагоприятного для жизни губки, происходит прорастание геммулы. Перед вылуплением тезоциты многократно делятся, теряя при этом свои включения, и трансформируются, таким образом, в популяцию гистобластов. После разрушения оболочки в области микропиле гистобласты мигрируют из капсулы и образуют двухслойную пинакодерму. В образовавшийся мешочек выселяются тезоциты, которые дают начало архецитам и склеробластам, формирующим мезохил новообразованной губки. На конечных этапах развития молодой губки из архецитов возникают хоаноциты, образующие хоаноцитные камеры. Гистобласты принимают участие в образовании внутренних каналов губки (рис. 6-9).

Сравнительное исследование индивидуального развития губок обнаруживает у них два типа организации онтогенеза. В первом случае, изредка встречающемся у некоторых *Demospongiae* (род *Tetilla*), осуществляется прямое, т.е., безличиночное развитие. Формирование тела молодой губки начинается сразу же после прохождения стадии бластулы. Второй тип онтогенеза с личиночным развитием и метаморфозом, характерен для подавляющего большинства губок. При развитии с личинкой паренхимой во время метаморфоза происходит замещение личиночных покровных структур. Источником нового покровного эпителия в этом случае служат клетки внутренней массы личинки. При развитии с личинками - бластулами (кальцибластулы, амфибластулы и др.) деструктивные процессы в ходе метаморфоза не имеют существенного значения. Дифференциация клеточных элементов молодой губки происходит главным образом на основе ресничных клеток бластулы.

Важной особенностью развития всех губок является *регионализация* тела зародыша, т.е. подразделение личинки на переднюю и задние области (Ересковский, 2002). Эта ранняя поляризация тела развивающегося индивидуума предопределяет образование апико-базальной оси молодого животного. Другой характерной чертой развития губок является сравнительно поздняя спецификация клеток, механизмы которой практически не исследованы. Насколько можно судить, детерминация судьбы клеток и направление их дифференциации определяется местоположением клеток и межклеточными взаимодействиями. Эти черты резко отличают эмбриональное развитие губок от развития низших билатеральных животных.

Обращает на себя внимание то, что в раннем развитии губок происходят разнообразные морфогенетические движения клеток. Перемещаться могут и индивидуальные клетки, и эпителиальные пласты. Первое наблюдается в случае ингрессии (погружении клеток с поверхности внутрь), или в случае эмиграции (вселении клеток из глубинных слоев в наружные). Наблюдаемые в раннем онтогенезе губок элементы морфогенетических процессов, в том числе эпителиальные морфогенезы, характерны для всех Metazoa. По-видимому, именно общность механизмов морфогенетических процессов определяет внешнее сходство личинок губок и стрекающих.

Итак, мы можем констатировать, что у губок имеется весь спектр элементарных морфогенетических движений, которые характерны и для двухслойных, и для трехслойных животных. Это дает основание предположить, что появление систем клеточной адгезии и механизмов ее пространственного и временного контроля было необходимой предпосылкой возникновения всех Metazoa.

## ГЛАВА 7. ДВУХСЛОЙНЫЕ

К числу древнейших многоклеточных относится и группа Двухслойных (Diploblastica), в состав которой входят тип Стрекающих (Cnidaria) и тип Гребневиков (Stenophora). Для животных этой группы характерны радиальный план строения тела и образование в раннем развитии двух зародышевых пластов: эктодермы и энтодермы. У гребневиков и некоторых стрекающих в ходе развития наблюдается преемственность между полюсом яйца, где закладывается первая борозда дробления, задней областью личинки и оральной областью взрослого животного.

### 7.1. Стрекающие

Тип Стрекающих насчитывает около 9000 видов, объединенных в несколько классов, среди которых наиболее обширными являются Hydrozoa, Scyphozoa и Anthozoa. В огромном большинстве Стрекающие --- морские животные, хотя и имеются виды, освоившие пресные и солоноватые воды. Это --- радиально-симметричные животные с орально-аборальной главной осью симметрии и относительно простым планом строения тела. Стенка тела образована двумя эпителиальными пластами --- внешним, или эпидермисом, и внутренним --- гастродермисом. Последний выстилает *гастроваскулярную полость (целентерон)*, которая выполняет и пищеварительную функцию, и обеспечивает циркуляцию веществ по телу животного. Гастроваскулярная полость сообщается с внешней средой отверстием, выполняющим одновременно функции и ротового отверстия, и ануса.

В состав эпителиальных пластов входят разнообразные клеточные элементы (рис. 7-1). В эпидермальном слое имеются эпителиально-мышечные, чувствительные, нервные, железистые и стрекающие клетки (*нематоциты*), а также недифференцированные мультипотентные интерстициальные клетки (i-клетки). В гастродермисе имеются эпителиально-мышечные и железистые клетки. Между эпителиальными пластами расположен внеклеточный матрикс -- мезоглея, степень развития которой сильно варьирует. В мезоглее различают характерный для базальных мембран коллаген IV типа, фибронектин, гепаран

сульфат протеогликан, ламинин и др. У Scyphozoa в мезоглее имеется самоподдерживающаяся популяция амебоцитов.

Для Стрекающих характерны два типа организации --- полипоидная и медузоидная. У многих видов, например, принадлежащих к метагенетическим Hydrozoa или к Scyphozoa, происходит закономерное чередование этих форм, или *метагенез* (рис. 7-2). В этом случае половое размножение связано с медузоидным поколением, тогда как для полипоидного поколения характерно бесполое размножение. Медузоидная фаза может редуцироваться или полностью исчезнуть (например, у представителей отряда Hydrida). Стадия медузы отсутствует и у кораллов, у которых и половое, и бесполое размножение обеспечивается полипами. С другой стороны, есть формы, представленные только медузами. Так, в жизненном цикле животных из отряда Trachylida полипоидная фаза отсутствует.

Часто полипы образуют колонии, имеющие общую гастроваскулярную полость. В колонии Hydrozoa имеются разные типы полипов, или *зооидов* (рис.7.1-2). Большая их часть представлена *гастрозооидами*, или питающими полипами; у некоторых видов образуются *дактилозоиды*, выполняющие благодаря обилию *книдоцитов* (от греч. κνίδη --- крапива) защитную функцию. Репродукцию осуществляют *гонозоиды*, или медузоидные почки, производящие гаметы. Медузоиды либо отделяются от колонии и превращаются в медуз, либо остаются в составе колонии в виде *гонофоров*.

Половые клетки образуются из интерстициальных клеток. Как показали исследования, выполненные на гидрах, среди i-клеток имеется особая популяция, коммитированная как линия половых клеток (рис.7-3). В процессе оогенеза важную роль в снабжении ооцита питательными веществами играют фагоцитоз и слияние клеток. Гонады у многих представителей данного типа имеют временный характер, хотя для Scyphozoa характерно образование постоянных гонад.

Оплодотворение у Стрекающих обычно наружное. Тем не менее, во всех классах Стрекающих имеются животные с внутренним оплодотворением,

вплоть до своеобразной копуляции, описанной у актинии *Sagartia*. В последнем случае педальные диски родительских особей образуют общую камеру, в полость которой выводятся гаметы и в которой оплодотворенные яйца развиваются до стадии личинки.

Два первых деления дробления меридиональные, а третье --- экваториальное. Обращает на себя внимание то, что борозды делений дробления не кольцевые, а врезающиеся: они начинаются у одного полюса оплодотворенного яйца и постепенно распространяются к противоположному, где связь между бластомерами наблюдается сравнительно длительное время (рис. 7-4).

Стрекающие отличаются большим разнообразием типов дробления. При полном и равномерном дроблении часто наблюдается радиальный характер расположения бластомеров. У некоторых видов, однако, связь между бластомерами слабая, так что они могут изменять свое положение относительно других клеток. Если происходит вращение бластомеров, то могут возникать фигуры, напоминающие по внешнему виду спиральное дробление, т. е. возникает *псевдоспиральность* (рис. 7-4). В других случаях дробящийся зародыш теряет определенность геометрических форм (анархический тип дробления, рис. 7-5). При неравномерном дроблении рисунок расположения бластомеров изменчив и неупорядочен. В яйцах, богатых желтком, цитотомия может запаздывать. У некоторых видов центральная масса желтка вообще не делится. В этом случае дробление принимает поверхностный характер.

Разнообразие форм дробления сказывается и на структуре бластулы. У Стрекающих описано несколько типов бластул: полая целобластула, образованная одним рядом клеток, которые окружают обширный бластоцель; плотная стерробластула, также образованная одним рядом клеток, но не имеющая бластоцеля; морула, и, наконец, перибластула, для которой характерно расположение внешнего слоя клеток на поверхности желточной массы. Клетки целобластулы снабжены жгутиками, которые обеспечивают движение.

На следующем этапе развития происходит гастрюляция, в ходе которой у Стрекающих происходит образование двух основных пластов тела: наружного пласта, или *эктодермы* (от греч. εκτος --- вне, снаружи; δερμα --- кожа, шкура), и внутреннего --- *энтодермы* (греч. εντος --- внутри, в).

У стрекающих животных описаны разнообразные клеточные механизмы формирования пластов тела. Широко распространена *ингрессия* (от лат. ingressus --- вступление, вхождение) или *иммиграция* клеток. При ингрессии некоторые клетки стенки целобластулы утрачивают жгутики, приобретают амебоидную подвижность и вселяются в полость бластулы, заполняя, в конечном счете, бластоцель полностью. Различают *униполярную ингрессию*, которая происходит в области зародыша, где впоследствии закладывается ротовое отверстие, и *мультиполярную ингрессию*, при которой вселение происходит по всей поверхности зародыша.

Заселение полости бластулы отдельными клетками может происходить и за счет ориентированных делений клеток стенки бластулы. Этот процесс называют *деламинацией* (от лат. de --- отделение, lamina --- пластинка, пласт). Клетки, попадающие после деления в полость бластулы, формируют энтодерму. Погружение клеток стенки бластулы может происходить и в составе эпителиального пласта. Такой тип эпителиального морфогенеза называют *впячиванием* или *инвагинацией* (от лат. invaginatio --- впячивание).

Образование эктодермы и энтодермы у морулы происходит в результате реаранжировки клеток. Клетки, занимающие внутреннюю область зародыша, дают энтодерму. Клетки внешнего слоя --- эктодерму. Это разделение пластов называют *морульной*, или *вторичной деламинацией*.

Наконец, у многих видов описана *эпиволия* (от греч. επιβολη --- облачение, покров) или обрастание крупных макромеров делящимися микромерами. Широко представлены также и смешанные типы обособления пластов.

В результате процесса гастрюляции возникает обычно радиально-симметричная двухслойная личинка --- *планула* (от греч. πλανοσ --- блуждающий) (рис. 7-6).



Наружный эктодермальный слой планулы образован ресничными клетками. Между эктодермой и энтодермой различается тонкий слой внеклеточного матрикса --- мезоглеи. На стадии планулы происходит дифференциация клеточных пластов. Так, в составе эктодермального эпителия появляются эпителиально-мышечные, железистые и сенсорные клетки. В промежутках между эпителиальными располагаются интерстициальные клетки и их производные, в том числе стрекательные клетки. Местом образования интерстициальных клеток является энтодерма, где и происходит их коммитирование. В энтодермальном эпителии образуются пищеварительные и железистые клетки. Планула имеет удлиненную форму и слегка расширена на переднем конце, который является преемником вегетативной области дробящегося зародыша. Обычно планулы лецитотрофны и необходимое для их жизни питание в виде желточных зерен, запасенных в период оогенеза, находится в их клетках. У некоторых Anthozoa описаны планктотрофные планулы, у которых образуется ротовое отверстие, возникающее из бластопора после завершения инвагинации.

Преобразование личинки во взрослую форму носит название *метаморфоза*. В ходе этого процесса личинка прикрепляется к субстрату передним концом или боковой поверхностью. Обычно тело планулы сплющивается в продольном направлении и превращается в диск, на котором вырастает полип, соединенный с диском стебельком (рис.7-7). У этого первичного гидранта --- родоначальника колонии --- образуются щупальцы и ротовое отверстие. В других случаях планула превращается в гидроризу, распластанное по субстрату нитевидное тело, на поверхности которого формируются полипы. Колониальные формы возникают за счет почкования первичных гидрантов.

Иногда формирование структур полипа начинается очень рано. В этих случаях личинка не удлиняется, а, напротив, сжимается по анимально-вегетативной оси. При этом будущая аборальная область уплощается, а оральная --- принимает вид конуса, на вершине которого образуется отверстие с окружающим его венчиком щупалец. На аборальном полюсе формируется стебелек. Возникший свободный полип или *актинула* (от греч. ακτινοϋζ --- луч) вскоре оседает и прикрепляется к субстрату (рис. 7-8).

У книдарий широко распространено бесполое размножение, которое может происходить как у полипов, так и медуз. За счет бесполого размножения первичного полипа возникают колониальные формы. При бесполом размножении гидроидных медуз резко возрастает численность популяции животных, способных к половому размножению

У Scyphozoa образующийся после оседания одиночный полип называется сцифистой, характерной особенностью которой является наличие септ --- вертикальных складок энтодермы, подразделяющих гастральную полость полипа на четыре кармана. Полипам Scyphozoa свойственно бесполое размножение почкованием и путем *стробилиции*. Стробилиция начинается в оральной области полипа и распространяется в аборальном направлении. Она состоит в последовательном образовании дисковидных элементов путем поперечных делений тела. Полип в фазе стробилиции называют *стробилой* (от лат. strobilus --- шишка). Отделяющиеся от стробилы диски образуют *эфир*ы или личинки медузы. Формирование эфир*ы* предполагает радикальную перестройку, связанную с утратой провизорных органов сцифистомы и развитием органов формирующейся медузы.

У некоторых Scyphozoa в результате почкования полипов образуются *подоцисты*, образования, которые могут длительное время находиться в покое. Затем подоцисты трансформируются в подвижные личинки. Нечто аналогичное имеет место и у Hydrozoa. Например, у представителей отряда Leptolida происходит *фрустуляция* (от лат. frustulum --- кусочек) --- своеобразная форма бесполого размножения путем фрагментации, в ходе которой возникают планулообразные личинки --- фрустулы.

Таким образом, у представителей разных классов Стрекающих бесполое размножение, происходящее на полипоидной или на медузоидной фазе жизненного цикла, может привести к формированию подвижной личинки, характерной для полового размножения. Это явление, по-видимому, можно расценить как свидетельство существования относительно автономных модульных подпрограмм развития, которые могут инициироваться как при

половом, так и при бесполом размножении. Проверка этого предположения требует специального исследования.

## 7.2. Гребневики

Гребневики, или ктенофоры (от греч. κτείζ --- гребень; φέρω --- нести) образуют обособленный тип животных, в составе которого насчитывается около 200 видов. Гребневики, как и стрекающие, относятся к радиальным животным (Radiata). В то же время они характеризуются двулучевой (бирадиальной) симметрией. На поверхности тела у гребневиков имеется восемь продольных рядов гребных пластинок. Гребневики --- двухслойные животные. Поверхность тела покрыта эпидермисом, поверхность кишки --- гастродермисом. Сильно развит внеклеточный матрикс, образующий толстый слой мезоглеи. Имеются специализированные мышечные элементы и мезенхима, которые, впрочем, не образуют выраженного мезодермального слоя. Тело вытянуто вдоль орально-aborальной оси. Имеются две основные плоскости симметрии: сагиттальная или глоточная, совпадающая с плоскостью глотки, и перпендикулярная ей латеральная или щупальцевая, проходящая через основания щупалец. Различают и третью, анальную, плоскость симметрии, которая проходит через диагонально расположенные анальные поры.

На оральном конце расположена глотка, имеющая эктодермальную выстилку. Глотка открывается в энтодермальный желудок с меридиональными каналами. Особые --- анальные --- каналы соединяют желудок с анальными порами. Имеется примитивная нервная система. На аборальном конце расположен апикальный сенсорный орган со статоцистом, органом, который воспринимает направление силы тяжести и координирует двигательную активность гребных пластинок.

Обычно гребневики --- гермафродиты. Мужские и женские гонады попарно располагаются вдоль меридиональных энтодермальных каналов (рис.7-9) под рядами гребных пластинок. Из половых желез гаметы поступают в половые синусы и, затем, выводятся через половые протоки. Возникновение у гребневиков постоянных гонад и, в частности, яичников, по-видимому, создало

необходимые условия для формирования яйцевых клеток с локализованными в пространстве сигнальными молекулами, которые обеспечивают раннюю спецификацию разнообразных клеточных линий.

Яйца у гребневиков централецитального типа: на поверхности расположена эктоплазма, богатая митохондриями и элементами эндоплазматической сети. Эктоплазма окружает массив богатой желточными включениями эндоплазмы. Ядро расположено эксцентрично, занимая пограничное между экто- и эндоплазмой место. Размеры яиц у разных видов варьируют от 130 мкм до 1200 мкм. Яйцо одето желточной оболочкой, которая в период овуляции разбухает, и студенистой оболочкой, вырабатываемой секреторными клетками яйцевода. У некоторых видов описана *диссогения* (от греч. δισσοζ--- двойной; γενος --- род), при которой половозрелость индивидуума достигается дважды --- в личиночном и во взрослом состоянии. Размеры яиц при этом заметно различаются: личинки продуцируют мелкие яйца, взрослые --- крупные, с диаметром в 2 --- 3 раза больше диаметра личиночных яиц.

Дробление ктенофор отличается большим своеобразием (рис.7-10). Деления дробления, подобно дроблению многих Стрекающих, униполярны. Расположенная на поверхности яйца эктоплазма перед началом дробления концентрируется на одном полюсе яйца. Именно здесь возникает борозда, которая, врезаясь в цитоплазму, распространяется к противоположному полюсу, увлекая за собой прозрачную эктоплазму. Обычно первая борозда дробления закладывается на редуционном полюсе, где выделяются редуционные тельца, образующиеся в ходе делений созревания. Перед следующим делением эктоплазма вновь стягивается к редуционному полюсу и вновь вместе с бороздой перемещается к аборальной области. После третьего деления эктоплазма остается в аборальной области. Своеобразие характера дробления обнаруживается при третьем делении, плоскость которого располагается почти параллельно плоскости первого деления дробления, но все же под некоторым углом к ней. В результате возникает пластинка из восьми клеток, расположенных в два ряда. Четыре концевых бластомера (Е-бластомеры, от англ. end --- конец) несколько мельче клеток, остающихся в середине полосы

или М-бластомеров (от англ. middle --- середина) (рис.7-10). Благодаря косому расположению плоскости третьего деления дробления концевые клетки смещены к аборальному полюсу.

Надо заметить, что вопрос о полярности яиц низших Metazoa в литературе последних лет подвергается переосмыслению. О. М. Иванова-Казас (1995) предлагает различать первичную (протозойную) и анимально-вегетативную полярности. Первичная полярность, по Ивановой-Казас, определяется местоположением редукционных делений, тогда как анимально-вегетативная полярность, отражает перспективное значение различных областей цитоплазмы яйца. Цитоплазма, занимающая анимальную область, связана с развитием эктодермальных производных, вегетативная --- с развитием энтодермы и мезодермы. С этой точки зрения анимально-вегетативная полярность у Губок отсутствует, поскольку у них нет эктодермы и энтодермы, и в ходе эволюции появляется лишь у Двухслойных. У Двухслойных факторы спецификации энтодермы, насколько можно судить по имеющимся данным, обычно локализируются в области редукционного полюса. Эта область дает, как мы видели, заднюю часть планулы Стрекающих, а позднее --- оральную область взрослого животного, в которой происходит закладка энтодермы. Из сказанного следует, что если редукционный полюс яиц Двухслойных функционально соответствует вегетативному полюсу, то деления дробления у них начинаются на *вегетативном* полюсе. Вопрос о полярности зародышей стрекающих требует дополнительных специальных исследований.

Раз возникнув, анимально-вегетативная полярность сохраняется у всех двухслойных и трехслойных Metazoa. Однако у Bilateria редукционному полюсу соответствует не вегетативный, как у Двухслойных, а анимальный полюс. Этот признак настолько консервативен, что, обычно, главным критерием анимального полюса у билатеральных животных как раз и служит отделение редукционных телец, происходящее в области яйца с наименьшей концентрацией желточных зерен. Цитоплазма, обогащенная желточными включениями, занимает вегетативную область и дает начало энтодерме

Экспериментально было показано (Freeman, 1977), что у Гребневигов оральным полюсом личинки становится полюс яйца, на котором появляется врезаящая борозда дробления. Фримен маркировал редуционный полюс яйца перед дроблением, и, подвергая оплодотворенные яйца центрифугированию, добивался смещения места возникновения униполярной борозды. В другом опыте он маркировал зону появления первой борозды (рис. 7-11). Выяснилось, что оральная область личинки формируется в той части яйца, где закладывается борозда первого деления дробления. Она не связана жестко с редуционным полюсом, где образуются редуционные тельца, хотя при нормальном ходе событий, без вмешательства экспериментатора, все эти явления (редуционные деления, закладка первой борозды, образование оральной области) сопряжены между собой. Проблема эволюции полярности яйца еще ожидает своего решения, которое нуждается в понимании эволюции молекулярных механизмов, управляющих процессами редуционных делений, делений дробления и первичной спецификации клеток зародыша.

Первые деления дробления Гребневигов определяют формирование осей животного. Так, плоскость первой борозды соответствует сагиттальной плоскости будущего гребневика. Перпендикулярная ей плоскость второго деления определяет положение латеральной плоскости симметрии. При четвертом делении отделяются обогащенные эктоплазмой аборальные микромеры (рис. 7-10). В ходе следующих делений эти клетки дают скопление относительно мелких клеток, которые в результате эпиболии распространяются от аборального к оральному полюсу зародыша (рис. 7-12).

Одновременно с этим происходит отделение и оральных микромеров, которые вместе с макромерами погружаются внутрь зародыша (рис. 7-12). В результате этого погружения образуется ротовое отверстие. Вскоре после гастрюляции начинается органогенез, в ходе которого развивается пищеварительная система, закладываются зачатки щупалец и формируются гребные пластинки. На аборальном полюсе дифференцируется сенсорный орган. После выхода зародыша из оболочек происходит формирования взрослой особи. Некоторые авторы считают, что поскольку на этой стадии у гребневигов основной план

строения тела сформирован, то у них нет личиночной стадии, и развитие у них --- прямое. Однако, поскольку на этой стадии животные имеют небольшие размеры, а форма тела все же существенно отличается от формы взрослых животных, многие исследователи полагают, что личиночная стадия у гребневиков все же имеется.

В опытах по изоляции или удалению бластомеров выявлен детерминативный характер раннего эмбриогенеза гребневиков, при котором спецификация клеточных линий происходит в период дробления. Уже в конце XIX столетия было показано, что разделение зародыша на стадии двух бластомеров ведет к образованию двух «половинных» личинок, каждая из которых имеет не восемь, а только четыре гребные пластинки (Chun, 1892). При изоляции клеток на стадии четырех бластомеров формируются личинки лишь с двумя рядами гребных пластинок.

Более поздние эксперименты (Freeman, 1976) обнаружили, что ограничение потенциалов разных областей яйца происходит в период оплодотворения. Яйца разрезали по экваториальной (рис.7-13, А) или орально-аборальной (рис.7-13, Б) плоскости на две половинки и оплодотворяли. В обоих случаях обе половинки обнаружили плюрипотентность: каждая из них давала личинку с полным набором гребных пластинок и щупалец. Однако, если разрезание в экваториальной плоскости производили на стадии закладки первой борозды, т.е. в период, когда эктоплазма концентрируется у орального полюса, развивалась лишь содержащая ядро оральная половинка, которая давала нормальную личинку. Аборальная часть яйца при изоляции погибала (рис.7-13, В). При разделении зародыша надвое в плоскости первой борозды дробления (рис.7-13, Г), каждый из двух бластомеров давал «половинную» личинку, которая имела лишь 4 гребных пластинки, половинку апикального сенсорного органа и одно щупальце. Дезагрегация зародыша на стадии четырех бластомеров (рис.7.-13, Д) вела к образованию «четвертинок» с двумя гребными пластинками, зачаточными щупальцами и рудиментарным апикальным органом.

Как оказалось, гребные пластинки образуются главным образом из микромеров, которые отделяются от бластомеров E (e-микромеры). Если на стадии 16 клеток удалить все четыре микромера e1, то гребные пластинки не закладываются. Локализация факторов, ответственных за развитие гребных пластинок и находящихся в эктоплазме яйца, происходит после оплодотворения в ходе первого деления дробления. Оказалось, что аналогично ведут себя и факторы, ответственные за спецификацию фотоцитов, клеток, которые при раздражении генерируют свет. До дробления эти факторы распределены по всему яйцу, но в ходе дробления они сосредотачиваются в центральных M-бластомерах и при последующих делениях сохраняются в макромерах (рис. 7-14).



## ГЛАВА 8. БИЛАТЕРАЛЬНЫЕ. LOPHOTROCHOZOA

В отличие от традиционной, современная филогенетика использует кроме морфологических молекулярно-биологические критерии. Анализ генов 18S рРНК и структуры кластерных *Hox*-генов существенно изменил наши представления о филогенетических взаимоотношениях билатеральных животных. По современным взглядам, Bilateria подразделяются на три основные группы --- Ecdysozoa и Lophotrochozoa, которые объединяют несколько типов Первичноротых, и Deuterostomia, или Вторичноротые (рис. 6.0-1). Нематоды и некоторые другие группы объединены теперь вместе с членистоногими в группу Ecdysozoa. К Lophotrochozoa относятся немертины, плоские черви, моллюски, аннелиды, т.е. типы, которые характеризуются спиральным типом развития, но также и брахиоподы, мшанки и форониды, раннее развитие которых основано на иных принципах. Вторичноротые объединяют полухордовых, иглокожих, головохордовых и хордовых. Как можно видеть, современная филогенетика отказывается от концепции членистых животных, как единой группы, включающей аннелид и членистоногих, сближая последних с нематодами.

Можно думать (подробнее см. т.2), что появлению и дивергенции различных типов билатеральных животных предшествовал длительный период эволюции, в течение которого произошло существенное возрастание сложности кластера *Hox*-генов.

Как полагают, общий предок Первичноротых имел в кластере, по крайней мере, 8 анцестральных *Hox*-генов (Peterson, Davidson, 199В). Среди них были 5 «передних» (*lab*, *pb*, *Hox3*, *Dfd*, *Scr*), два «центральных» (один из которых впоследствии дал *fushi tarazu*, *Antp*, *Lox5* и другие *Antp*-подобные гены, а другой --- *Ubx*), и один «задний» (*AbdB*-подобный ген). Общий предок всех билатеральных животных имел, по меньшей мере, 6 *Hox*-генов.

### 8.1. Спиральные

Относимые к Lophotrochozoa животные за исключением почти всех щупальцевых, а именно немертины, многие плоские черви, кольчатые черви и моллюски имеют так называемый спиральный тип развития. Отклонения от этого типа, наблюдаемые у некоторых турбеллярий, а также у паразитических форм --- цестод и трематод, коррелируют с особенностями генезиса желтка и потребления питательных веществ в раннем эмбриогенезе.

Спиральный тип дробления возник в глубокой древности и стал важной предпосылкой ранней эволюции билатеральных животных. Основные представления об особенностях спирального типа развития были заложены исследованиями конца 19-го начала 20-го столетия (Kowalevsky, 1871; Whitman, 1878; Wilson, 1889, 1892; Child, 1900; Ivanoff, 1928 и др.). Исследования эмбриологии Spiralia в настоящее время переживают новый подъем, обусловленный развитием новых методов.

Несмотря на очевидные резкие различия морфологии взрослых животных, особенности раннего развития немертин, моллюсков, аннелид и многоветвистых турбеллярий свидетельствуют о едином принципе организации начальных этапов их онтогенеза, что, естественно, дает веские основания для предположений о филогенетической близости этих билатеральных первичноротых. Так, использование современной техники маркировки клеток позволило Генри и Мартиндейлу установить очевидное сходство карт презумптивных зачатков у немертин, плоских червей с соответствующими картами аннелид и моллюсков (Henry, Martindale, 1998).

Спиральный тип дробления характеризуется четко выраженной и неизменной последовательностью событий. Это чрезвычайно существенно, так как благодаря своей инвариантности спиральный тип дробления стал эффективным инструментом пространственной организации *паттерна* (от англ. pattern --- рисунок, узор) личиночных структур. В процессе дробления происходит направленная сегрегация цитоплазматических факторов яйца, которые специфицируют разнообразные клеточные линии в строго определенных областях зародыша.

Первые две борозды дробления проходят меридионально под прямым углом друг к другу (рис.8-1). После первого деления образуются бластомеры, которые обозначаются индексами АВ и CD. При втором делении возникают бластомеры А, В, С и D, которые называют *квадрантами* (от лат. quadrans --- четвертая часть). При описании последующих стадий развития часто говорят о принадлежности потомков этих бластомеров к тому или иному квадранту зародыша. В случае равномерных первых двух делений имеет место *гомоквадрантное* дробление, при неравномерных делениях, что бывает значительно чаще, --- *гетероквадрантное* (рис.8-2).

Бластомер D ("Дэ большое") содержит факторы, играющие важную роль в спецификации клеточных линий, дающих начало эктодерме и мезодерме взрослых животных. Благодаря концентрации активной цитоплазмы этот бластомер часто выделяется своими крупными размерами и несколько эксцентричным положением. У некоторых видов аннелид и моллюсков активная цитоплазма в период первых делений дробления обособляется в виде полярной лопасти, материал которой, в конечном счете, попадает в бластомер D (рис.8-3). При гомоквадрантном дроблении спецификация макромера D, как предшественника стволовых мезодермальных клеток, происходит принципиально иным способом, а именно в результате взаимодействия между макромерами и микромерами, которые впервые появляются при третьем делении дробления. Оказалось, например, что у моллюска *Patella*, имеющего гомоквадрантное дробление, бластомер 4d образует мезодермальные клетки лишь в том случае, если перед его обособлением макромер 3D вступит в контакт с микромерами анимального полушария (Van den Biggelaar, Guerrier, 1979). Следует подчеркнуть, что именно в этот период развития между указанными бластомерами образуются щелевые соединения (gap junction), что создает условия, необходимые для прохождения низкомолекулярных веществ из клетки в клетку.

Характерной особенностью спирального дробления является косое расположение веретен делений относительно анимально-вегетативной оси яйца. Наклонное расположение веретен характерно для всех делений, включая и самые первые, но наиболее четко оно начинает проявляться с третьего деления,

в результате которого в анимальном полушарии образуются микромеры, которые располагаются в промежутках между макромерами (рис.8-4). Смещение blastomeres при третьем делении обычно происходит по часовой стрелке (вправо), если смотреть на дробящееся яйцо с анимального полюса. Такое деление называют *дексиотропным* (от лат. dexter --- правый, греч. τροπή --- поворот, направление), или *правозакрученным*. Смещение blastomeres против часовой стрелки называют *левозакрученным* или *леотропным* (от лат. laevus --- левый) делением (рис.8-5). При последующих делениях макромеров происходит чередование наклона веретена: если третье деление правозакрученное, то таким же будут все нечетные деления макромеров (пятое, седьмое и т.д.), тогда как четные деления будут левозакрученными. Этот характер дробления генетически детерминирован и коррелирует с левым или правым положением blastomeres D, а у моллюсков и с характером закручивания висцеральных органов и раковины. В опытах на *Lymnaea peregra* показано, что инъекция цитоплазмы из *декстральных* яиц в *синистральные* (от лат. sinister --- левый), дающие левозакрученных животных, восстанавливала правозакрученный характер, тогда как реципрокная инъекция цитоплазмы от синистральных яиц в декстральные не оказывала действия. Это указывает на доминирующий характер материнских факторов правозакрученности, которые, как можно полагать, синтезируются в период оогенеза под контролем гена правозакрученности.

Морфологические и экспериментальные исследования показали, что судьба каждого blastomeres при спиральном дроблении predetermined. Обычно, начиная с третьего деления, дробление идет квартетами: каждый раз практически одновременно отделяются четыре клетки --- по одной в каждом квадранте. Квартеты обозначаются буквенными и цифровыми индексами. Буква означает принадлежность к тому или иному квадранту, а цифра --- номер квартета. При этом квартеты макромеров обозначаются прописными буквами, а микромеров --- строчными. Так, основной квартет A --- D при третьем делении дробления отделяет первый квартет микромеров 1a ("один а малое"), 1b, 1c, 1d, превращаясь при этом в первый квартет макромеров 1A, 1B, 1C, 1D. В ходе четвертого деления дробления образуется второй квартет микромеров 2a --- 2d, и второй квартет макромеров 2A --- 2D. Обычно образуется четыре квартета

микромеров, после чего деления квартета макромеров приостанавливаются. Продукты делений микромеров сохраняют обозначение исходного микромера, которое дополняется цифровыми показателями --- одним при первом делении микромера, двумя --- при втором и т.д. Например, при делении микромера первого квартета из квадранта A1a образуются две клетки  $1a^1$  ("один а малое один") и  $1a^2$ , при делении  $1a^2$  возникают микромеры  $1a^{21}$  ("один а малое два один") и  $1a^{22}$  и т.д. После седьмого - восьмого делений дробления закономерное чередование дексиотропных и леотропных делений нарушается.

Как уже отмечалось, детерминируется не только положение бластомера, но и его судьба. Продукты деления первых трех квартетов микромеров дают эктодерму и эктомезодерму. Так, производные первого квартета образуют эктодерму предротовой области личинки трохофоры. Расположенные в области анимального полюса клетки  $1a^1$  ---  $1d^1$  образуют апикальный сенсорный орган личинки. Клетки  $1a^2$  ---  $1d^2$  дают первичные трохобласты (рис. 8-6), продукты деления которых рано дифференцируются и формируют двигательный орган личинки --- *прототрох*. Клетки второго квартета  $2a$  ---  $2d$  дают эктодерму остальной части личинки. Бластомер  $2d$  называют первым соматобластом, так как продукты его деления дают эктодермальную спинную пластинку зародыша, а некоторые производные этой клетки образуют зону роста тела червя.

Клетка  $4d$ , или второй соматобласт у гастропод дает начало как энтеробластам, так и парным симметрично расположенным мезобластам. Пролиферация этих стволовых клеток ведет к образованию билатеральных мезодермальных полосок, которые впоследствии формируют мезодерму туловища.

Клетки основного квартета вместе с энтеробластами, возникшими при делении  $4d$ , впоследствии погружаются вглубь зародыша и образуют энтодерму.

В период дробления наряду с увеличением клеточной массы и спецификацией клеточных линий одновременно происходит и очень ранняя детерминация осей будущей личинки. Так, положение микромеров  $2d$  и  $4d$ , за счет которых образуется большая часть тела взрослого животного, соответствует дорсальной стороне. Медиальная линия, подразделяющая тело на левую и правую

половины, проходит, как правило, между нечетными квартетами микромеров квадранта С и D. Оси будущего зародыша во многом определяются уже на стадии четырех бластомеров. При этом анимальный полюс соответствует переднему концу зародыша, а вегетативный --- заднему. Появление первого квартета микромеров, как было уже сказано, определяет возникновение сагиттальной плоскости и билатеральной симметрии зародыша.

В результате дробления образуется бластула. У многих видов моллюсков и аннелид формируется стерробластула, у которой бластоцель отсутствует или слабо выражен. Вместе с тем известны виды, у которых возникает типичная целобластула (например, у моллюска *Patella*).

После выделения клеточных линий происходит гастрюляция --- морфогенетический процесс, в ходе которого уже детерминированные клеточные линии преобразуются в зародышевые зачатки --- эктодерму, мезодерму и энтодерму.

При наличии бластоцеля гастрюляция происходит путем инвагинации клеток вегетативной области. У *Patella* и некоторых других моллюсков описана особая форма инвагинации --- плотное вращение или *эмболия*, при которой макромеры вытягиваются вдоль анимально-вегетативной оси зародыша, заполняя, таким образом, бластоцель (рис.8-7). Затем вследствие деламинации клеток внутреннего слоя образуется энтодермальный зачаток --- первичная кишка, или архентерон.

Наиболее распространенным способом гастрюляции у моллюсков и аннелид является эпиболия, в ходе которой клетки, образующие шапочку анимальных микромеров, распространяются в направлении вегетативного полюса, обрастая макромеры и образуя эктодермальный слой личинки (рис.8-8). В конце эпиболии остается незамкнутым небольшой участок на вегетативном полюсе --- бластопор. Мезобласты и продукты их делений также оказываются под эктодермой и образуют зачаток мезодермы.

Среди животных со спиральным типом развития различаются формы с непрямым и прямым развитием. В первом случае после гастрულიции формируется билатерально симметричная личинка, имеющая обычно все основные (кроме репродуктивной) системы жизнеобеспечения: пищеварительную, нервную, локомоторную, выделительную.

У многощетинковых червей и некоторых моллюсков эта личинка называется *трохофорой*. Типичная трохофора (от греч. τροχός--- круг, φέρο--- нести) (рис.8-9) имеет особый орган движения --- *прототрох*, который в виде кольца ресничных клеток окружает тело личинки, располагаясь перед ее ротовым отверстием. Прототрох подразделяет тело личинки на две области: головной отдел, или *эписферу* (*простомиум*), лежащий перед ротовым отверстием, и задний отдел, или *гипосферу* (*перистом*), расположенный сзади от прототроха (рис.8-10). В задней области личинки формируются зона роста и несегментирующаяся часть тела --- пигидий (от греч. πυγαιον --- зад, гузка). У многих видов кроме прототроха имеются дополнительные круги ресничных клеток. Например, впереди пигидия образуется *телотрох*, в средней части перистома --- *мезотрох* и т.п. В посторальной области трохофоры располагаются мезобласты, в результате деления которых образуются две билатерально расположенные мезодермальные полоски. Рост мезодермальных полосок коррелирует с удлинением задней части тела личинки.

На следующем этапе развития у полихет происходит сегментация тела личинки, которая осуществляется в два этапа. Сначала в эктодерме посторального отдела трохофоры появляются зачатки пароподий, а на брюшной стороне возникают зачатки нервной цепочки. Вслед за этим сегментируются и мезодермальные полоски. При этом клетки мезодермальных сегментов расходятся и образуют целомические полости. Сегментированную личинку называют *метатрохофорой* или *нектохетой* (рис.8-11). В посегментно расположенных щетинконосных мешках нектохеты формируются щетинки. Все сегменты метатрохофоры появляются одновременно. Число этих первичных, или ларвальных сегментов обычно специфично для вида. В отличие от ларвальных сегментов тела червя, или постларвальные сегменты, образуются последовательно в зоне роста личинки, плюрипотентные клетки которой, как

полагают, образуются в результате дедифференциации эктодермы задней области тела нектохеты. Зона роста дает начало не только эктодермальным производным (покровы, пароподии, нервные ганглии), но и мезодерме червя. Возникающая в зоне роста мезодерма образует по обеим сторонам кишечника симметрично расположенные скопления клеток, которые со временем преобразуются в целомические мешочки.

Существование принципиальных различий в развитии сегментов тела животных было открыто нашим выдающимся соотечественником П. П. Ивановым (1912, 1928). Оно было названо им *первичной гетерономностью сегментов*, в отличие от вторичной гетерономности сегментов, которая может возникать в ходе адаптивной эволюции как приспособительное видоизменение морфологии сегмента.

Различия между ларвальными и постларвальными сегментами касаются не только способов их развития. Они обнаруживаются и в особенностях их дефинитивного строения. Так, в ларвальных сегментах не образуются половые железы, целомодукты, хлорогенные клетки, имеются некоторые отличия в строении брюшной нервной цепочки и кровеносной системы. Накапливающиеся данные по генетике развития полихет дают основание предполагать, что свойства ларвальных и постларвальных сегментов определяются неидентичными генетическими программами развития.

Несомненно, что первичная гетерономность сегментов имеет глубокие филогенетические основания, сущность которых еще предстоит раскрыть. Возникновение онтогенетического механизма, который обеспечивает *субтерминальный* рост тела животного за счет зоны роста, расположенной на переднем краю анальной лопасти, по-видимому, стал важным этапом в эволюции животных, открыв путь для развития разнообразных полимерных форм Metazoa.

У некоторых наиболее примитивных видов моллюсков из подкласса Prosobranchia имеются свободноживущие трохофоры. Обычно, однако, наблюдается *эмбрионизация*, т.е. смещение стадии трохофоры в эмбриональный



период, так что из яйца выходит характерная для моллюсков личинка *велигер* (от лат. *velum* --- парус) (рис.8-12), которая имеет видоизмененный, сильно разросшийся прототрох --- парус, и зачаток раковинной железы, за счет активности которой формируется личиночная раковина. У представителей ряда семейств пластинчатожаберных моллюсков (например, из семейства Unionidae) образуются особые личинки --- *глохидии* (от греч. *γλῶχις* --- острие стрелы). Створки раковинок глохидиев снабжены крючковидными шипами, что позволяет этим личинкам паразитировать на жабрах и коже рыб (рис. 8-13).

Многие пресноводные и наземные представители Spiralia утратили стадию личинки и характеризуются *прямым развитием*, при котором из яиц выходят уже сформированные молодые животные, минуя личиночную стадию. Прямое развитие характерно для пиявок, олигохет, многих легочных моллюсков.

**Турбеллярии.** Характеризуя спиральный тип нельзя не упомянуть об особенностях развития Турбеллярий, плоских свободноживущих червей. Развитие паразитических форм Плоских червей, которые представлены тремя классами животных (Моногенеи, Цестоды и Трематоды), в данной книге не рассматривается.

Турбеллярии издавна привлекают внимание эволюционистов-зоологов. Интерес к этой группе определяется, прежде всего, предполагаемым ключевым положением Ресничных червей в филогении Metazoa (В.~Н.~Беклемишев, 1964; Ю.~В.~Мамкаев, 1967; А.~В.~Иванов, 1968; О.~М.~Иванова-Казас, 1995). Согласно классической точке зрения, бескишечные турбеллярии (Acoela), составляющие один из отрядов Ресничных червей, произошли от фагоцителлообразных предков, и дали начало всем первичноротым животным (А.В. Иванов, 1968). Указанные авторы считают, что отсутствие кишечника (ротовое отверстие у них открывается непосредственно в пищеварительную паренхиму) свидетельствует о примитивности Acoela. Нельзя не заметить, однако, что данные об ультраструктуре пищеварительной паренхимы, а также специализированный дуэтный тип дробления, напротив, расценивается некоторыми исследователями как безусловное свидетельство эволюционной вторичности этой группы (Smith, Tyler, 1985; Ellis, Fausto-Sterling, 1997). Тем не менее, молекулярно-биологические исследования говорят в пользу существования особого типа Acoelomorpha, в который входят Acoela и Nemertodermatida. Как полагают, тип Acoelomorpha является анцестральным, стоящим у основания Билатеральных животных. С другой стороны, турбеллярии Rhabditophora и родственные им Catenulida близки таким трохофорным целомическим животным, как Моллюски и Кольчатые черви (Lockier et al., 2002).

Дробление у представителей Acoela имеет своеобразный дуэтный тип, при котором основу формирования зародыша составляют не четыре квадранта, а всего лишь два основных макромера. Спиральное дробление, соответственно, начинается уже при переходе к стадии четырех бластомеров: при втором делении базальные макромеры отделяют «дуэт» --- два микромера, которые располагаются в борозде между макромерами. Вслед за первым дуэтом

отделяется еще несколько (рис. 8-14). Деление микромеров начинается обычно после обособления всех дуэтов. За счет микромеров образуется эктодерма. Макромеры погружаются вглубь зародыша и дают начало общему энтомезодермальному зачатку, представленному клеточной паренхимой.

Среди турбеллярий различают две группы животных. Представители одной из них (*Archophora*) имеют обычные эндолецитальные яйца. У других (*Neophora*) описан экзолецитальный тип развития. В этом случае яйцо лишено желтка, но зато имеются специализированные желточные клетки, которые вместе с яйцом откладываются в особый кокон, или капсулу, в котором происходит развитие зародыша.

Дробление у турбеллярий спиральное, голобластическое и отличается большим разнообразием форм. У Многоветвистых турбеллярий имеет место спиральное дробление с типичными квартетами микромеров и чередованием дексиотропных и леотропных делений (рис. 8-15). У некоторых турбеллярий описана сольная, или «монетная» (от греч. *μονος* --- один), форма спирального дробления, при которой микромеры возникают последовательно из одного макромера. У червей из подкласса *Neophora* спиральный характер дробления часто нарушается и приобретает неупорядоченный характер. Заметно варьирует и время спецификации бластомеров. Как показывают опыты по изоляции бластомеров, дробление у представителей *Polyclada* носит детерминативный характер, в отличие от регулятивного развития бескишечных турбеллярий.

У более высокоорганизованных турбеллярий из отряда *Polyclada* богатые желтком бластомеры 4a --- 4c и 4A --- 4D в построении тела зародыша не участвуют. Они разрушаются и используются как питательный материал. Источником образования энтодермы и мезодермы становится бластомер 4d. В результате деления этого *мезэнтобласта* образуется клетка-родоначальница мезодермы (4d<sup>1</sup>) и клетка-родоначальница энтодермы (4d<sup>2</sup>). Из микромеров первого квартета образуются нервные клетки. Эктодерма возникает из микромеров первых трех квартетов. С помощью прижизненного мечения бластомеров показано, что каждый квадрант (A, B, C, D) дробящегося яйца дает определенный квадрант личинки (Henry et al., 1995) (рис. 8-16).

Развитие у турбеллярий может быть прямым или с личинкой. Лобофора (от греч. λοβός --- лопасть, φέρω --- носить) или Мюллеровская личинка имеет удлинненное билатерально-симметричное тело, покрытое ресничками, и несущее восемь лопастей, окаймленных ресничным шнуром (рис. 8-17).

Экзолецитальное развитие Neophora отличается рядом особенностей. Так, спиральность дробления различима только на ранних этапах дробления. Возникшая целобластула уплощается, и часть ее клеток образует своего рода зародышевую оболочку, которая распространяется по скоплению желточных клеток. Желточные клетки фагоцитируются особыми вителлофагами (рис. 8-18).

При рассмотрении особенностей раннего развития животных, относимых к группе Spiralia, нельзя не обратить внимания на существенные различия типов, входящих в эту группу. Действительно, мы видим среди Spiralia как паренхиматозных, не имеющих вторичной полости тела животных (Плоские черви, Немертины), так и животных с хорошо развитой целомической полостью (Аннелиды, Моллюски). Тело может быть несегментированным (Плоские черви, Немертины), сегментированным (Аннелиды) или утратившим сегментацию (Моллюски). В эволюции животных со спиральным типом развития обнаруживаются две взаимоисключающие тенденции: полимеризация (Аннелиды) и олигомеризация (Моллюски) тела.

Таким образом, спиральный тип дробления с его механизмами строго детерминированного распределения цитоплазматических факторов спецификации клеточных линий по бластомерам, с образованием уже в период дробления телобластов --- клеток-предшественниц зачатков разнообразно дифференцированных органов и тканей создает предпосылки быстрого и эффективного формирования личинки трохофорного типа. Однако направление дальнейшего развития личинки непосредственно не связано со спиральным типом развития и обеспечивается иными механизмами. По-видимому, именно возникновение в процессе эволюции новых механизмов постларвального развития и предопределило становление принципиально различных типов животных, общность происхождения которых, тем не менее, обнаруживается в

организации их раннего онтогенеза. С другой стороны, утрата механизмов спирального дробления, вызванная теми или иными причинами, по-видимому, лежит в основе формирования брахиопод и других Lophotrochozoa, ранний онтогенез которых не несет признаков спиральности.

Сопоставляя спиральный тип развития с развитием радиальных животных, следует подчеркнуть важную особенность, которая возникает у Spiralia, а именно возникновение функциональной асимметрии квадрантов дробящегося яйца. Действительно, если у ктенофор эмбриональные квадранты следуют практически идентичным программам дробления и генерируют очень сходные по своему тканевому составу и общей морфологии области тела, то у Spiralia происходит специализация квадранта D, предопределяющая его участие в образовании эктодермы и мезодермы туловища животного.

## 8.2. Щупальцевые

Вторую обширную группу, входящую в состав Lophotrochozoa, представляют животные, относящиеся к типу Щупальцевых (Tentaculata). Этот тип объединяет форонид, мшанок и плеченогих. Щупальцевые представлены преимущественно морскими формами. Несмотря на сидячий образ жизни, они сохраняют билатеральную симметрию. Характерной особенностью является наличие целома. Ротовое отверстие окружено щупальцами, которые располагаются на особом выросте --- *лофофоре* (от греч. λοφοζ --- грива, султан; фороζ--- несущий).

У наименее специализированных форм Щупальцевых, а именно, у некоторых форонид дробление имеет признаки спиральности (рис. 8-19), хотя у многих видов оно является радиальным. В ходе дробления образуется целобластула. В процессе гастрюляции путем инвагинации образуется энтодермальный зачаток, тогда как мезодерма обособляется вследствие иммиграции клеток из вентральных областей архентерона.

У форонид образуется пелагическая планктотрофная личинка --- *актинотроха* (рис. 8-20). У актинотрохи имеется предротовая лопасть или капюшон, по краю

которого проходит ресничное кольцо, гомологичное прототроху аннелид (Иванова-Казас, 1977). За ротовым отверстием формируется подковообразный эктодермальный валик, на котором закладываются зачатки щупалец личинки. Венчик щупалец также снабжен длинными ресничками, что дает основание гомологизировать его с метатрохом Аннелид. Наконец, на заднем конце личинки образуется телотрох, расположенный впереди от анального отверстия. Находящиеся в первичной полости мезодермальные клетки образуют целомический эпителий, мышцы и кровеносные сосуды. В послеротовой области позднее закладывается брюшной карман, представляющий собой эктодермальное впячивание.

Превращение актинотрохи в дефинитивную форму обусловлено разрастанием цилиндрического выступа на брюшной стороне личинки как раз в области закладки брюшного кармана (рис. 8-21). Разрастаясь, этот выступ дает стебелек будущей форониды. В процесс образования стебелька вовлекается и кишка, которая, как бы втягивается в стебелек, образуя петлю характерную для всех Щупальцевых. Вместе с тем анальное отверстие остается в области лофофора, т.е. неподалеку от ротового отверстия.

Развитие мшанок, несмотря на длительную историю его изучения, таит еще много невыясненных вопросов. В результате дробления, которое у мшанок обычно имеет радиальный характер, образуется целобластула. Гастрюляция у разных видов происходит разными способами. У некоторых мшанок происходит погружение вегетативных клеток внутрь зародыша (эмболия), у других наблюдается иммиграция. У ряда видов имеется эпиболия. Интересной особенностью развития многих мшанок является то, что у их личинок не образуется энтодермальный кишечник. В этих случаях возникающая в ходе гастрюляции внутренняя клеточная масса личинки представлена только мезодермальными клетками.

Типичной личинкой мшанок является так называемый *цифонаут* (рис. 8-23). Эта личинка имеет конусовидную форму. Оральная область находится в основании конуса, а аборальная --- на его вершине. По краю оральной области расположен кольцевидный локомоторный орган, образованный несколькими

рядами ресничных клеток. Из эктодермы формируется мантия, клетки которой генерируют хитиноидную двустворчатую раковину. У планктотрофного цифонаута имеется вполне развитая пищеварительная система с ротовым отверстием, глоткой, энтодермальным желудком, эктодермальной задней кишкой и анальным отверстием.

У большинства видов мшанок пищеварительный канал недоразвит или полностью отсутствует. Например, у *Bugula neritina* внутренняя полость личинки заполнена паренхимой (рис. 8-24).

Для мшанок из отряда Круглоротых характерно явление полиэмбрионии. Развитие зародышей происходит в фолликулах, которые образуются в теле гонозооидов за счет мезодермальных элементов. Фолликулы, имеющие синцитиальное строение, обеспечивают питание зародыша. Бластомеры дробящегося яйца обнаруживают значительную автономность. Они могут разъединяться и вновь соединяться друг с другом, образуя морулоподобный зародыш, который состоит из клеток двух типов: эктодермальной и мезодермальной природы. За счет питающего синцития такой *первичный зародыш* растет и, достигая определенных размеров, фрагментируется на *вторичные зародыши*, сохраняя при этом преемственность наружного (эктодермального) и внутреннего (мезодермального) листков. Вторичные зародыши при обособлении имеют около 60 клеток. У некоторых видов описана и *третичная* генерация зародышей, которые образуются за счет фрагментации вторичных. В результате из одного яйца может сформироваться более ста личинок. Образующиеся личинки имеют относительно простое строение. У них нет кишечника, ресничного венчика и некоторых других органов, типичных для цифонаута. По-видимому, цифонаут, который многие исследователи рассматривают как своеобразно измененную трохофорную личинку, в ходе эволюции мшанок подвергся вторичному упрощению, в ходе которого редуцировались многие личиночные органы. Причины и значение этих эволюционных преобразований мало понятны и являются вызовом для новых поколений эмбриологов.

## ГЛАВА 9. БИЛАТЕРАЛЬНЫЕ. ECDYSOZOA.

Молекулярно-биологические исследования обнаружили филогенетическое единство ряда типов билатеральных животных, в том числе круглых червей и членистоногих, для которых характерна линька и которые теперь объединяются в новый монофилетический таксон Ecdysozoa (от греч. εκδυσίζ -- - вылупление, линька). Для представителей Ecdysozoa характерной особенностью является то, что их тело покрыто экзоскелетом, который по мере роста животного периодически обновляется в ходе линек.

### 9.1. Нематоды

Круглые черви или нематоды --- обширная группа, представленная как свободноживущими, так и паразитическими формами, поражающими растения и животных. Нематоды отличаются огромной эволюционной пластичностью, позволила им занять практически все экосистемы --- водные, наземные, почвенные, а с учетом форм, паразитирующих на птицах и насекомых, и воздушные. По современным оценкам, тип круглых червей --- один из самых крупных в царстве животных, в составе которого имеется, по-видимому, более ста миллионов видов.

Тело круглых червей несегментировано, имеет кожномускульный мешок и первичную полость. Характерной особенностью нематод является их неспособность формировать реснички. Тело покрыто жесткой кутикулой (экзоскелет), которая вместе с подлежащей гиподермой противостоит мощному гидростатическому давлению внутри тела ("гидроскелет").

Развитие прямое: выходящее из яичевых оболочек животное представляет собой ювенильную форму. Рост молодых животных, так называемых "личинок", возможен благодаря линькам, во время которых старая кутикула замещается новой. У многих круглых червей описана эутелия, т.е. постоянное, характерное для данного вида число клеток, образующих тело животных, (от греч. ευτελής-- -экономный, бережливый). В конце эмбрионального развития особи мужского пола нематоды *Caenorhabditis elegans* состоят всего из 560 клеток, а взрослые



самцы имеют 1031 соматическую клетку, тогда как гермафродитные особи --- 959 клеток.

Эмбриональное развитие подробно изучено лишь у паразитической нематоды *Parascaris equorum* и у почвенной нематоды *Caenorhabditis elegans*, которая стала модельным объектом биологии развития и, прежде всего, объектом молекулярной биологии развития. Естественно, что столь ограниченный круг исследованных объектов не позволяет выявить в полной мере особенности организации эмбриогенеза, характерные для всего типа в целом. Действительно, до последнего времени существовало мнение, что развитие круглых червей характеризуется высокой степенью детерминативности и инвариантности. Лишь сравнительно недавно исследование ряда видов морских свободноживущих нематод показало, что раннее предопределение судьбы бластомеров происходит, вероятно, далеко не у всех видов. На основании опытов с маркировкой бластомеров морской нематоды *Enoplus brevis* делается вывод даже о плюрипотентности бластомеров и регулятивном характере раннего эмбриогенеза. Очевидно, что дальнейший сравнительно-эмбриологический и экспериментальный анализ внесут ясность в эту принципиально важную проблему.

Первым исследователем эмбриологии аскарид был Теодор Бовери (1862 --- 1915), который дал ставшее классическим описание ранних стадий развития *Ascaris megalcephala* (ныне --- *Parascaris equorum*). Он обратил внимание на то, что в течение нескольких первых делений дробления во время митоза происходит так называемая диминуция хроматина, отбрасывание небольших фрагментов хромосом. Оказалось, что диминуция хроматина наблюдается лишь в тех бластомерах, потомки которых образуют соматические ткани. Диминуция хроматина отсутствует в клетках полового пути (рис. 9-1А). Как выяснил Бовери в опытах с нарушением дробления при диспермном оплодотворении и после центрифугирования оплодотворенных яиц, диминуция хроматина или ее отсутствие определяются разными свойствами цитоплазмы, образующей анимальную и вегетативную области яйца (рис. 9-1Б). Следует заметить, что у большинства нематод, в том числе и у *C. elegans*, диминуция хроматина не наблюдается.

Дробление *Parascaris* полное, билатерально симметричное (рис. 9-2) Положение бластомеров в пространстве строго фиксированное. Первое деление происходит в экваториальной плоскости, в результате чего образуется два бластомера --- анимальный АВ (S1) и вегетативный P1. Индекс "P" указывает на принадлежность этой клетки к линии клеток полового (или, как иногда не вполне корректно говорят, "зародышевого") пути. Индекс "S" свидетельствует о соматической природе клетки. Действительно бластомер АВ является источником эктодермы. Второе деление бластомеров происходит в разных направлениях. Клетка АВ делится меридионально на клетки А и В, а бластомер P1 имеет борозду, расположенную параллельно экваториальной плоскости. При делении P1 возникают бластомеры S2 (EMSt) и P2. Такое деление дает Т-образную фигуру (рис 9-2 Б), которая, однако, вскоре принимает вид ромба, поскольку расположенный на вегетативном полюсе бластомер P2 смещается в переднем направлении и приходит в контакт с бластомером В (рис 9-2 В,Г)).

При следующем делении S2 образует переднюю клетку MSt, и заднюю --- Е. Бластомер MSt при последующих делениях дает начало популяциям мезодермальных клеток (m и  $\mu$ ) и клеткам зачатка стомодеума (st и  $\sigma$ t). P2 делится на вентральную P3 и дорсальную S3 (или С-клетку --- основательницу клона дорсальной эктодермы).

При переходе к стадии 16-и бластомеров P3 делится на эктодермальную клетку D и клетку-основательницу полового зачатка P4, которая делится и образует две первичные половые клетки G1 и G2.

Генеалогия бластомеров и паттерн раннего развития *P. equorum* имеют большое сходство с таковыми *C. elegans* (рис 9-3, рис. 9-4). Тем больший интерес представляют результаты исследования эмбриогенеза этого модельного объекта биологии развития, выполненные с помощью цейтраферной видеозаписи и компьютерного анализа изображений (Schnabel et al., 1997). Точная регистрация времени делений клеток, их первоначального положения в развивающемся зародыше и последующего перемещения обнаружила вариабельность этих параметров, которая ранее ускользала от исследователей. Вместе с тем, несмотря на выявленную изменчивость ранних зародышей перед началом

морфогенеза возникает инвариантная стадия со строго фиксированными дискретными областями, клетки которых имеют вполне определенную спецификацию. Инвариантность клеточной судьбы, как полагают, определяется специфическими индуктивными межклеточными взаимодействиями на ранних стадиях развития, когда топология бластомеров у разных зародышей еще достаточно однообразна, чтобы обеспечить воспроизводимость паттернов индукции.

На стадии 24-х клеток, т.е. после выделения клетки полового зачатка P4 дочерние клетки бластомера E погружаются внутрь зародыша, где после нескольких делений образуют среднюю кишку, состоящую из 20 клеток. При этом перемещении клеток E на вентральной поверхности зародыша возникает слабо выраженный бластопор. Через это же отверстие внутрь зародыша позднее перемещаются и первичные половые клетки, располагающиеся под зачатком кишки. В это же время перемещаются внутрь и клетки MSt. Процесс погружения клеток-основательниц внутрь зародыша круглых червей сопровождается распространением эктодермального пласта в вентральном направлении и завершается замыканием бластопора. Совокупность этих перемещений, в результате которых клетки-основательницы энтодермального и мезодермального клонов, равно как и клетки полового зачатка и зачатка глотки оказываются внутри зародыша, создает предпосылку формирования трехслойного зародыша и может быть названа гастрულიацией (от греч. γαστήρ --- желудок).

## **9.2. Членистоногие (Arthropoda).**

Членистоногие --- самый обширный тип животных. Это билатеральные животные, имеющие сегментированное тело и метамерно расположенные членистые конечности. Сегментация гетерономная, т.е. сегменты в разных областях тела резко различаются своим строением. Сходные сегменты образуют крупные отделы тела, или тагмы (от греч. ταγμα --- строй, порядок). У членистоногих насчитывают три тагмы --- голова, грудь и брюшко. Сегменты и тагмы могут сливаться друг с другом, образуя сложные комплексные структуры. Спереди тело ограничено головной лопастью, или акроном (от греч. ακρον --- на самом краю), сзади --- анальной лопастью, или тельсоном (от греч.

τελσον --- граница). Членистоногие имеют наружный хитиновый скелет. Хитиновая кутикула ограничивает рост развивающегося животного, который поэтому возможен только при условии линьки, т.е. периодической смены затвердевающего покрова. Как у всех Ecdysozoa у Членистоногих отсутствуют ресничные покровы.

Тип членистоногих подразделяется на четыре основных подтипа: подтип ныне вымерших трилобитов (Trilobitomorpha), подтип хелицеровых (Chelicerata), жабернодышащих (Branchiata) и трахейных (Tracheata). Филогенетические отношения между этими подразделениями Членистоногих в настоящее время представляются дискуссионными (рис. 9-5). Данные молекулярной филогении, основанные на анализе последовательностей ДНК рибосомных генов и некоторых митохондриальных генов, сближают Насекомых с Ракообразными. С другой стороны, согласно традиционным взглядам, Насекомые объединяются вместе с Многоножками в подтип Трахейных или Неполноусых, поскольку у этих животных имеется лишенный конечностей интеркалярный сегмент, возникший вследствие редукции второго антеннального сегмента ракообразных. В пользу родства Многоножек и Насекомых говорит как будто бы наличие у них трахейной системы, которая отсутствует у Ракообразных. Согласно современным взглядам, образование и трахейной системы, и мальпигиевых сосудов у многоножек и насекомых происходило в ходе эволюции независимо, конвергентно, и, таким образом, представляет собой *гомоплазию* (Wilkins, 2001). Эволюция Насекомых связана по сравнению с Ракообразными с редукцией числа преоральных и туловищных придатков, а также с исчезновением ветвления ног. Интересно, что такой важный систематический признак как неразветвленность ног Насекомых обусловлен сравнительно простым генетическим механизмом --- отсутствием активности гена *wnt* в дорсальной области имагинального диска конечности (Struhl, Basler, 1993).

### 9.2.1. Хелицеровые

Характерной особенностью Хелицеровых является деление тела на два отдела -- *просому* (от греч. *προ* --- находящийся впереди, *σῶμα* --- тело), которая

образуется за счет слияния головы и груди, и *опистому* (от греч. *οπισθιο* --- задний) или брюшко. На головогруди имеется 6 пар конечностей. Впереди рта расположена первая пара конечностей --- *хелицеры*, выполняющие роль челюстей. Позади рта находятся *педипальпы*.

**Мечехвосты.** Довольно крупные яйца мечехвостов (2-3,5 мм) богаты желтком и имеют толстую оболочку --- хорион (от греч. *χοριον* --- укрепление), которая защищает яйцо, откладываемое в песок. Дробление полное, расположение борозд не имеет фиксированного паттерна. Своеобразная анархичность дробления проявляется и в характере делений *первичных* бластомеров морулы, состоящей из 120 - 130 клеток. Деления первичных бластомеров асинхронны, поэтому некоторое время зародыш представляет собой мозаику из мелкоклеточных областей (результат деления первичных бластомеров) и крупных клеток, еще не возобновивших деление (рис. 9-6).

Зародышевые листки образуются путем деламинации: поверхностные, сравнительно бедные желтком клетки дают эктодерму. Крупные клетки, расположенные внутри зародыша, становятся энтодермой.

В будущей вентральной области зародыша образуется сгущение эктодермы --- *зародышевое пятно*, или *диск*. Между этим эктодермальным утолщением и энтодермой за счет деления одного из бластомеров формируется мезодерма, которая вскоре после своего возникновения дает начало четырем парам сегментов. В задней области зародыша за счет пролиферативной активности поверхностного эпителия независимо возникает еще одно скопление мезодермальных клеток. Выселение клеток мезодермы из наружного слоя клеток (эктобласта) сосредоточено в узкой области на заднем конце, которую иногда называют первичной полоской (Иванов, 1924, 1933). Здесь образуется своего рода зона роста, за счет размножения клеток которой образуется мезодерма всех остальных сегментов (рис. 9-7). По аналогии с Аннелидами, одновременно возникающие четыре сегмента называют *ларвальными*, а образующиеся в зоне роста на заднем конце --- *постларвальными*, хотя они и формируются в период эмбрионального развития. Четыре ларвальных и три

передних постларвальных сегмента образуют единую головогрудь. За счет остальных постларвальных сегментов формируется брюшко.

Наличие двух способов формирования мезодермы у мечехвостов, которые, как мы видели, характерны и для Аннелид, можно, по-видимому, рассматривать как свидетельство существования подобного же явления у представителей некой анцестральной группы билатеральных животных, давшей начало видам, представленным в линиях Lophotrochozoa и Ecdysozoa.

**Паукообразные.** Класс паукообразных (Arachnoidea) представлен разнообразными, главным образом, наземными животными. К паукообразным относятся скорпионы, сольпуги, пауки, сенокосцы, клещи и другие. Многообразны и типы развития этих животных.

Яйца у многих паукообразных централецитальные. Лишь у некоторых скорпионов они имеют телолецитальный характер. Соответственно, дробление может быть поверхностным или дискоидальным. В централецитальных яйцах пауков ядро, расположенное в центральной области, делится без цитотомии. Образующиеся ядра по тяжам цитоплазмы выходят на поверхность и образуют бластодерму, уплощенные клетки которой окружают желток. Желток иногда подразделяется на отдельные территории, не имеющие, впрочем, клеточной структуры.

Зародышевые листки в случае дискоидального дробления образуются путем деламинации (скорпионы). При поверхностном дроблении перед гастрულიей за счет концентрации клеток на будущей вентральной стороне зародыша сначала формируется зародышевый диск, который позднее вытягивается в виде полоски. На заднем конце *зародышевой полоски* происходит ингрессия клеток эктобласта с образованием либо мезэнтодермы, которая лишь впоследствии подразделяется на энтодерму и мезодерму (пауки), либо мигрирующие клетки изначально репрезентируют энтодерму и мезодерму (клещи).

Как и у мечехвостов, у паукообразных мезодерма возникает из двух источников. После образования первичной мезодермы, которая сегментируется

и дает несколько «ларвальных» сегментов, на заднем конце зародыша образуется зона роста, где благодаря миграции клеток эктобласта образуется мезодерма, входящая в состав последовательно закладывающихся «постларвальных» сегментов. Местоположение границы между этими группами сегментов варьирует, но часто оно соответствует заднему краю просомы.

У скорпионов, которые развиваются с образованием зародышевого диска, из периферической области последнего развиваются зародышевые оболочки --- амнион и сероза, структуры, которые независимым образом, конвергентно, возникают и в эмбриогенезе насекомых (рис. 9-8).

У пауков подробно описано замечательное явление --- бластокинез или реверсия (рис.9-9). Благодаря реверсии масса желтка, которая в период формирования зародышевой полоски находится на спинной стороне зародыша, попадает на его вентральную сторону. Симметричные половинки полоски разъединяются по медиальной вентральной линии за исключением головного и хвостового участков, и вслед за этим начинают движение, как бы "плывут", по поверхности желтка. Поверхность яйца в промежутке между расходящимися половинками покрыта лишь тонким слоем эктодермы. Движение завершается, когда ранее свободные латеральные участки полоски смыкаются друг с другом на спинной стороне.

### **9.2.2. Многоножки**

Многоножки --- типичные наземные животные, с удлинённым телом, в составе которого различается головной отдел и сегментированное туловище. Многочисленные членики туловища снабжены конечностями.

Яйцо многоножек содержит большое количество желтка и имеет сравнительно крупные размеры. У обычной для наших широт сколопендры шарообразные яйца достигают 3~мм в диаметре. Ядро ооцита, окружённое скоплением цитоплазмы, расположено в центре яйца.

Дробление обычно имеет поверхностный характер, хотя у некоторых многоножек из группы Symphyla дробление полное и завершается формированием морулы. Часто при дроблении происходит образование *желточных пирамид* --- конусовидных подразделений желтка, разделенных цитоплазматическими тяжами. По этим тяжам происходит выселение ядер из центральной области яйца на его периферию (рис. 9-10). Выход ядер на поверхность яйца сопровождается целлюляризацией, в результате которой возникает бластодерма. В силу асимметричной миграции ядер, или благодаря неравномерной интенсивности пролиферации на поверхности яйца образуется зародышевый диск, состоящий из нескольких слоев клеток.

Зародышевый диск вытягивается в длину, в результате чего образуется зародышевая полоска. Под поверхностным эктодермальным слоем клеток зародышевой полоски располагаются два симметричных тяжа мезодермы, разделенных свободным пространством по срединной линии зародыша (рис. 9-11). Выселяющиеся из полоски клетки располагаются на поверхности желтка, образуя энтодермальную эпителию, или погружаются в желток, давая начало так называемым желточным клеткам, или *вителлофагам*, участвующим в переработке и утилизации желтка. Интересно, что у *Scutigera*, одного из представителей губоногих многоножек, вителлофаги, по-видимому, формируют среднюю кишку, так что их можно рассматривать как энтодермальную зачатку. У других видов энтодерма возникает помимо вителлофагов. Анализируя проблему образования энтодермы у многоножек, О.~М.~Иванова-Казас, отмечает большое разнообразие способов ее возникновения. Так, у Губоногих многоножек энтодерма образуется путем диффузной иммиграции клеток вдоль всей зародышевой полоски; либо путем иммиграции на переднем и заднем концах полоски, или, наконец, в результате униполярной иммиграции на заднем конце полоски. У Двупарноногих многоножек энтодерма образуется иным способом, а именно, обособляясь от зародышевой полоски в виде клеточных тяжей, растающих внутрь зародыша (О.~М.~Иванова-Казас, 1981). Что касается мезодермы, то она образуется в результате ингрессии клеток по всей длине зародышевой полоски.



Сегментация тела у многоножек происходит в два этапа. Первый этап приурочен к эмбриональному периоду, когда одновременно образуется относительно небольшое число сегментов. Второй этап происходит после вылупления личинки, когда сегменты формируются последовательно за счет активности особой зоны роста.

После сегментации вследствие продолжающегося роста зародышевой полоски ее передний и задний концы загибаются на спинную сторону. Завершающий этап формирования тела животного, как и у пауков, связан с *бластокинезом*, в ходе которого происходит, во-первых, расхождение симметричных половинок зародышевой полоски в дорсальном направлении, и, во-вторых, движение переднего и заднего отделов зародыша в направлении вентральной стороны тела. Вследствие этих процессов голова и задняя область туловища возвращаются на вентральную сторону, где образуется разделяющая их глубокая складка.

### **9.2.3. Жабродышащие. Ракообразные.**

Класс ракообразных --- единственный в подтипе Жабродышащих. Ракообразные --- первичноводные членистоногие. Они отличаются большим разнообразием форм и подразделяются на пять подклассов, из которых четыре относятся к низшим, а один --- к высшим ракам.

Тело обычно четко подразделено на три отдела --- голову, грудь и брюшко. Число сегментов, составляющих тело, у разных видов сильно варьирует (от 5 до 50). Головной отдел состоит из акрона и четырех сегментов, снабженных придатками. Акрон несет антеннулы, на первом сегменте развиваются антенны, а остальные головные сегменты являются челюстными: они снабжены видоизмененными конечностями, которые обеспечивают измельчение захваченной пищи.

Число сегментов грудного отдела и брюшка стабильно только у высших раков. У *Malacostraca* грудь образована восемью, а брюшко --- шестью сегментами. Имеется анальная лопасть, или тельсон. Конечности груди, снабженные

жабрами, служат для передвижения. Брюшные конечности имеются только у высших раков. Часто они выполняют не двигательную, а какую-либо иную функцию, в частности, дыхательную.

Типы яйцевых клеток, равно как и способы дробления, у ракообразных многообразны. У животных с изолецитальными яйцами дробление обычно равномерное и имеет черты спиральности. При наличии телolecитальных яиц дробление --- гомо- или гетероквадрантное, и может быть отнесено к радиальному типу. В случае центролецитальных яиц дробление поверхностное.

У веслоногих и ветвистоусых, яйца которых содержат мало желтка, дробление полное (рис. 9-12). Характер расположения бластомеров обнаруживает значительное разнообразие. У некоторых животных обнаруживаются признаки спиральности. У тех же видов, яйца которых характеризуются обилием желтка, как, например, у ветвистоусого рачка *Leptodora*, дробление поверхностное. Делящиеся ядра по цитоплазматическим тягам перемещаются из центральной области яйца на его периферию, где они образуют бластодерму. Поверхностный характер дробления наблюдается и у высших раков с богатыми желтком яйцами. Выход ядер на поверхность яйца и образование бластодермы наблюдается, например, у мизид. После образования бластодермы за счет концентрации клеток на будущей вентральной стороне зародыша формируется зародышевый диск (рис. 9-13). У некоторых видов этот диск образуется за счет амeboидной подвижности индивидуальных клеток, вышедших на поверхность зародыша.

У некоторых паразитических веслоногих дробление резко неравномерное. В ходе дробления на поверхности очень крупной и богатой желтком клетки, из которой впоследствии образуется энтодерма, формируется колпачок мелких клеток (рис. 9-14). Эти клетки, продолжая делиться, дают начало эктодерме и мезодерме.

Разнообразны и способы гастрюляции. У ракообразных встречается образование мезодермального и энтодермального листков за счет иммиграции, полярного врастания клеток, за счет эпиболии и, наконец, с помощью инвагинации. Часто

отмечается двухфазность гастрюляции, что проявляется в одновременном образовании мезодермы и энтодермы. У жабронного рака *Arthemiasalina* гастрюляция имеет именно такой сложный характер. Сначала происходит иммиграция клеток на заднем конце зародыша. Эти клетки образуют мезодермальный зачаток, который вскоре сегментируется (рис. 9-15). Несколько позже в передней области в виде единого зачатка инвагинирует эпителиальная стенка бластулы, содержащая материал энтодермы и эктодермального стомодеума. Типичная инвагинационная гастрюла характерна для развития циклопов (рис. 9-16). Гастрюляция путем эпиволии ярко выражена у паразитического веслоногого *Lernaeocera branchialis* (рис. 9-17). Своеобразие этого эпиволического процесса состоит в том, что он не ограничивается просто обрастанием энтодермальных клеток, но сопровождается одновременным отделением (деламинацией) мезодермальных клеток, которые располагаются между экто- и энтодермой.

У некоторых ракообразных уже перед началом гастрюляции удается установить судьбу клеток, расположенных в разных областях зародышевого диска. Так, у *Hemimysis lamornae* зародышевое пятно имеет V-образную форму (рис. 9-18). В его средней части располагаются клетки рано обособляющейся половой линии, которые дадут половой зачаток. Каудальнее располагается материал будущей энтодермы, а латеральнее лежат эктотелобласты, служащие источником образования постларвальной эктодермы, а также клетки, которые в ходе гастрюляции образуют мезодерму.

Знакомство с развитием ракообразных убедительно свидетельствует о том, что формирование основного плана строения животного не зависит напрямую ни от типа дробления, ни от способа гастрюляции: *один и тот же план строения может достигаться разными путями*. Все разнообразные способы дробления и гастрюляции у ракообразных ведут к развитию билатерально симметричного зародыша с тремя парами зачатков конечностей (антеннулы, антенны и мандибулы) в головной области (рис. 9-19). На заднем конце зародыша возникает зона роста, в которой расположены эктодермальные и мезодермальные телобласты, за счет активности которых формируется тело животного с его грудными и абдоминальными сегментами. По-видимому, в

яйце имеется какая-то система сигналов, предопределяющая направление морфогенетических процессов. Природа генетических программ развития, существо молекулярно-биологических механизмов, лежащих в основе морфогенетических процессов, у ракообразных практически не разработаны.

Эктотелобласты и мезотелобласты являются стволовыми клетками, т.е. клетками, деления которых асимметричны: одна из дочерних клеток сохраняет статус стволовой, тогда как другая вступает на путь специализации. При каждом делении эктотелобластов возникает один ряд эктодермальных клеток. В результате пролиферации этих клеток формируется пространственно ограниченная совокупность клеток, своего рода «генеалогическая единица». В результате дифференциации этой совокупности, формируется парасегмент, который соответствует задней четверти одного сегмента и трем четвертям следующего сегмента. Таким образом, каждое деление эктотелобластов обеспечивает формирование одного парасегмента. Эта особенность развития, связанная с парасегментной организацией тела развивающегося животного, характерна, как мы увидим, и для насекомых.

Обычно эмбриональное развитие Ракообразных завершается образованием личинки --- *науплиуса* (рис. 9-20). У высших раков, однако, науплиальная стадия проходит в яйце, и эмбриональный период завершается образованием молодого животного или личинки, тело которой образовано не только науплиальными, но и *метанауплиальными сегментами*, которые последовательно возникают в зоне роста за счет активности экто- и мезобластов.

Как у всех Ecdysozoa, покровный эпителий секретирует кутикулу, которая, затвердевая, ограничивает рост. Рост становится возможным благодаря периодическим линькам, в промежутках между которыми к ларвальным сегментам науплиуса добавляются новые сегменты. Эта особенность развития является одной из причин существования многочисленных метанауплиальных личиночных форм ракообразных. В качестве примера можно привести креветок, у которых науплиус после линьки трансформируется в *протозоэ*. Протозоэ после ряда линек дает личинку *зоэ* с характерным заостренным шлемом,

стебельчатыми глазами и тремя парами максиллопедий (рис. 9-21). Наконец, зоа превращается в ювенильную форму животного.

#### 9.2.4. Насекомые

Класс насекомых отличается огромным разнообразием видов. Он подразделяется на два подкласса: подкласс Первичнобескрылых (*Apterygota*) и подкласс Крылатых насекомых (*Pterygota*). Тело насекомого расчленено на три отдела или *тагмы*: голову, грудь и брюшко. Голова состоит из *акрона* и пяти слившихся сегментов; грудь образована тремя сегментами. В составе брюшка 10 - 12 сегментов и *тельсон*. Сегменты первых двух отделов имеют характерные придатки. В голове различают антенны, верхнюю губу, мандибулы, максиллы и нижнюю губу. Все сегменты груди имеют по одной паре ног. На дорсальной стороне второго и третьего сегмента груди Крылатых насекомых образуются крылья. Сегменты брюшка конечностей обычно лишены.

По характеру развития Крылатые насекомые подразделяются на две группы. Для представителей одних отрядов характерно постепенное превращение ювенильных постэмбриональных форм во взрослое животное. Для представителей других отрядов, напротив, характерно радикальное изменение личинки. Соответственно этому различают насекомых с неполным превращением (*Hemimetabola*) и с полным превращением (*Holometabola*). На рис. 9-22 представлена одна из схем филогенетических отношений основных отрядов насекомых, из которой видно, что полное превращение является эволюционным приобретением и характеризует сравнительно молодые отряды. Из этой же схемы следует, что имеется определенная корреляция между характером развития и особенностями организации оогенеза. Если для *Apterygota* и *Hemimetabola* характерны паноистические яйцевые трубки, то *Holometabola* присущи в основном мероистические яичники, причем у перепончатокрылых, бабочек и мух --- это так называемые политрофные мероистические яичники (см. Главу 1). Такая корреляция примечательна. Она позволяет думать, что эволюционные преобразования, затрагивающие репродуктивную систему животных, важны не только непосредственно для репродуктивных процессов *per se*, но, открывая новые возможности для

организации оогенеза, косвенным образом могут затрагивать существенные события онтогенеза животных.

За исключением бескрылых Ногохвосток и ряда живородящих и паразитических видов крылатых насекомых (щитовки, наездники и др.), у которых дробление полное, насекомые имеют поверхностный тип дробления яйца, что связывают с исключительно высоким содержанием желтка. Яйцо обычно имеет достаточно жесткую наружную оболочку --- *хорион*, защищающий зародыш от механических повреждений и высыхания. При осеменении спермии проникают в яйцо через особое отверстие хориона --- *микропиле*, которое обычно расположено на переднем конце яйца, хотя у некоторых насекомых, например, у Прямокрылых (*Orthoptera*) положение микропиле может быть и иным.

Деление ядра зиготы, которое окружено цитоплазматическим "двориком", происходит автономно, не сопровождаясь делением цитоплазмы. В результате синхронных кариокинетических делений возникают многочисленные ядра. Ядерные энергиды, т.е. ядра с окружающей их цитоплазмой, согласованно перемещаются по цитоплазматическим тязам из глубоких слоев яйца на его периферию (рис. 9-23).

В период делений ядер и вплоть до их выхода на поверхность яйца зародыш имеет синцитиальную структуру. Это своеобразие ранних этапов развития имеет существенные физиологические последствия. Действительно, отсутствие разделяющих ядра клеточных мембран исключает возможность межклеточных взаимодействий с помощью лигандов и мембранных рецепторов, и, вместе с тем, обеспечивает свободную диффузию РНК и белков, запасенных в период оогенеза или синтезированных после оплодотворения, по всему зародышу, если они специально не зафиксированы в какой-либо области яйцевой клетки. Эти условия распространения сигнальных молекул у ранних зародышей насекомых резко отличаются от того, что имеется у животных, дробящиеся зародыши которых имеют клеточную структуру.

После выхода ядер в поверхностный слой цитоплазмы яйца --- *периплазму* (у Дрозофилы это происходит в конце 9-го цикла дробления) образуется *синцитиальная бластодерма* (рис. 9-24, А-Б). В результате формирования мембран, разграничивающих клеточные территории, поверхность зародыша дробится на отдельные клетки ("поверхностное дробление") и возникает *клеточная бластодерма* (рис. 9-24, Д).

Часть *энергид дробления* остается в желтке, становясь *вителлофагами* (от лат. vitellus --- желток; греч. φαγειν--- пожирать). Вителлофаги --- это специализированные, часто полиплоидизированные клетки, которые участвуют в переработке и усвоении желтка. Образуемый вителлофагами желточный синцитий, возможно, играет и морфогенетическую роль, способствуя направленному разрастанию зародышевой полоски.

*Зародышевая полоска* образуется в виде сгущения клеток бластодермы, которое обычно возникает на вентральной стороне яйца. Такое сгущение происходит, прежде всего, благодаря изменению формы клеток, которые в области полоски становятся столбчатыми. Различают три типа зародышевых полосок: *короткие*, *полудлинные* (промежуточные) и *длинные* (рис. 9-25). Короткие имеют вид диска, материал которого дает начало сегментам головы, тогда как рост зародыша обеспечивается лежащей сзади от диска пролиферативной зоной. Полудлинные зародышевые полоски широко распространены у Hemimetabola, они образуют два вентролатеральных скопления клеток, которые смыкаются на вентральной стороне и дают начало голове и сегментам груди, тогда как остальные сегменты формируются за счет пролиферации клеток зоны роста. Длинные полоски характерны для Holometabola. Они содержат материал всех сегментов и не имеют зоны роста, занимая не менее 80% длины яйца.

Как показывают наблюдения за судьбой клеток зародышевой полоски, ее медиальная часть на большем своем протяжении занята материалом презумптивной мезодермы, тогда как передняя и задняя области полоски --- презумптивной энтодермой. По бокам от медиальных зачатков располагаются симметричные полоски нейроэктодермы.

Способы обособления зародышевых листков у насекомых многообразны. Погружение материала будущей мезодермы и энтодермы иногда происходит одновременно, но иногда эти процессы разобщены во времени и происходят независимо. Разнообразны и механизмы перемещения клеточного материала с поверхности зародыша. У многих насекомых происходит иммиграция, т.е. выселение отдельных клеток, которые располагаются между эпибластом и желтком. У некоторых видов погружающиеся вглубь клетки не теряют эпителиальной структуры. Так, например, у *Scolia quadripunctata* имеет место своеобразная *эпиболия*. В ходе этого процесса медиальная часть зародышевой полоски отделяется продольными бороздами от ее латеральных частей. Последние своими свободными краями нарастают навстречу друг другу по поверхности отделившейся медиальной полоски и смыкаются, в конце концов, по средней линии зародыша. У многих насекомых, в том числе и у дрозофилы, происходит инвагинация медиальной части зародышевой полоски, в результате которой формируется продольно расположенная мезодермальная трубка (рис. 9-26). На стадии гаструляции в той области, где происходит иммиграция, инвагинация или эпиболия, некоторое время сохраняется продольная бороздка.

После отделения или инвагинации презумптивной мезодермы эктодерма латеральных областей зародыша смыкается по вентральной медиальной линии (рис. 9-27). Этот материал специфицирован как нейроэктодерма, которая служит источником нейронов и глиальных клеток, и которая дает начало нервной системе насекомого. Нервные элементы иммигрируют с поверхности зародыша и располагаются под эктодермой. Нейроны каждого сегмента образуют ганглии, которые с помощью нейральных отростков объединяются в единую систему. Симметричные ганглии, лежащие в пределах одного сегмента, соединяются двумя комиссурами. С ипсилатеральными ганглиями, т.е. с ганглиями, лежащими на одной и той же стороне тела (от лат. *ipse* --- сам) они соединяются с помощью коннектив.

Энтодермальные зачатки средней кишки образуются обычно на переднем и заднем концах зародышевой полоски (рис. 9-28). Впоследствии в области этих зачатков происходит инвагинация эктодермы и образуются --- на переднем конце --- *стомодеум*, эктодермальный зачаток передней кишки, и на заднем



конце --- *проктодеум*, эктодермальный зачаток задней кишки. На границе между задней и средней кишкой формируются органы выделительной системы насекомого --- мальпигиевы трубочки, открывающиеся в заднюю кишку.

Одновременно с гастрულიей происходит растяжение зародышевой полоски. У видов с длинной зародышевой полоской в результате этого процесса зародышевая полоска, распространяясь по срединной линии зародыша, огибает заднюю оконечность желточной массы, и движется в переднем направлении по спинной стороне зародыша. При этом задний конец полоски приближается к ее переднему концу. В период растяжения полоска обнаруживает первые признаки метамеризации, поскольку образуются парасегменты и детерминируются границы будущих сегментов тела (подробнее см. том 2). На следующем этапе развития происходит сокращение длины зародышевой полоски, и ее задний конец вновь совпадает с задней оконечностью желточной массы.

Однослойная эктодерма, находящаяся за пределами зародышевой полоски, образует боковые складки, которые растут навстречу друг другу в вентральном направлении, смыкаясь по медиальной линии (рис. 9-29). В результате возникают две зародышевые оболочки. Внешний листок складки становится --- *серозой* (от лат. *serosus* --- водянистый), которая распространяется на дорсальную область зародыша. Внутренний листок формирует *амнион* (от греч. *αμνιον* --- чаша, в которую собирали кровь приносимой жертвы), эпителиальный пласт которого составляет единое целое с эктодермой зародыша. В результате этого процесса образуется замкнутая амниотическая полость, которая заполняется особой амниотической жидкостью, омывающей зародыш. Возникновение в процессе эволюции серозы и амниона обеспечило благоприятную среду для развития зародыша, и, предотвратив опасность высыхания зародыша, послужило важным фактором завоевания суши насекомыми.

Предполагается, что формирование зародышевых оболочек первоначально возникло как следствие своеобразного перемещения зародыша вглубь яйца, процесса, который носит название *бластокинеза*. Бластокинез характерен для видов с короткой и полудлинной зародышевой полоской и состоит из двух фаз.

В первой фазе, которая обозначается как *анатрепсис* (от греч. *ανα---* вверх; направлять; *τρεπω---* поворачивать), происходит погружение зародыша в желток. Погружение начинается на заднем конце зародышевой полоски. Задний конец погружается внутрь желтка и поворачивается там на 180°. Благодаря движению задней области полоски в направлении переднего конца яйца зародыш приобретает сначала U-образную форму, а затем вновь принимает линейную форму, но теперь головная область погруженного в желток зародыша обращена назад. При этом перемещении связанная с зародышем внезародышевая эктодерма также увлекается вглубь желтка, в результате чего между вентральной стороной зародыша и желтком образуется амниотическая полость, ограниченная со стороны желтка однослойной внезародышевой оболочкой, амнионом (рис. 9-30). Остающаяся на поверхности яйца внезародышевая эктодерма представляет собой серозу.

Во второй фазе бластокинеза (*кататрепсис*, от греч. *κατα ---* сверху вниз, *τρεπω---* поворачивать) идет обратный процесс, в результате которого зародыш, теперь уже сегментированный и имеющий развитые придатки, выходит на поверхность. У эволюционно относительно молодых видов с длинной полоской истинный бластокинез отсутствует, хотя описанное выше растяжение и сокращение зародышевой полоски, в ходе которых также образуются амнион и сероза, видимо, можно рассматривать как процесс, имеющий общие корни с бластокинезом (Иванова-Казас, 1995).

В эмбриональный период происходит и формирование гонад. Если у представителей примитивных отрядов первичные половые клетки обособляются на сравнительно поздних стадиях развития, то у многих *Holometabola*, например, у Дрозофилы, они возникают, как уже говорилось, в период дробления и образования бластодермы (см. главу 1).

Попадающие в заднюю область яйца ядра дробления окружаются полярной плазмой и обособляются в виде полярных клеток, которые как бы выталкиваются на поверхность яйца (рис. 9-23). В ходе гаструляции первичные половые клетки погружаются внутрь зародыша, локализуясь в заднем зачатке

средней кишки. В период растяжения полоски они перемещаются на дорсальную сторону яйца и вместе с задней областью средней кишки смещаются вперед (рис. 9-31). Соматическая часть гонады формируется за счет латеральной мезодермы. В мезодермальном зачатке гонады экспрессируется ген *columbus*. Соответствующий белок служит аттрактантом, привлекающим мигрирующие первичные половые клетки. У Дрозофилы зачаток гонады закладывается в пятом брюшном сегменте, при этом в состав гонады входит мезодерма V-VIII брюшных сегментов. Мезодермальные элементы проникают между гоноцитами и образуют фолликулярный эпителий яйцевых трубочек и сперматоцит.

Эмбриональный период у насекомых завершается появлением личинки. От взрослых насекомых вылупившиеся личинки отличаются, прежде всего, небольшими размерами и в тысячи раз меньшей массой. У личинок не полностью развита половая система, отсутствуют крылья и некоторые другие органы взрослых форм, или *имаго* (от лат. *imago* --- изображение, портрет). Вместе с тем личинки имеют свои специфические органы, позволяющие им продолжать развитие, рост и накопление энергетических резервов, которые потребуются на стадии имаго для процессов размножения. Адаптивное значение личиночной стадии очевидно. Именно благодаря личиночной стадии становится реальным создание энергетического запаса, необходимого для достижения дефинитивного состояния и продолжения рода.

Поскольку покровный эпителий насекомых, как и у всех Ecdysozoa, вырабатывает жесткий кутикулярный экзоскелет, рост и развитие личинки возможны только благодаря периодическим линькам, в ходе которых покровы животного утрачивают связь с кутикулой. После линьки, или *экдизиса* (от греч. *ἐκδύσις* ---удаление), открывается возможность роста. У насекомых, как и других членистоногих, имеются особые гормоны, контролирующие процессы линьки. Гормоном линьки служит экдизон, который вырабатывается в особых проторакальных (экдизиальных) железах личинок. Под влиянием экдизона в гиподерме личинки стимулируется пролиферация клеток и инициируется отделение кутикулы. Поддержание способности к линькам обеспечивается ювенильным гормоном, который продуцируется так называемыми

прилежащими телами (*corpora allata*). Хирургическое удаление *corpora allata* ведет к преждевременному прекращению линек и формированию карликовых животных. Наоборот, трансплантация прилежащих тел от молодых личинок поздним продлевает период линек и способствует образованию ненормально крупных насекомых (Pflugfelder, 1958).

Начавшийся после линьки период роста завершается образованием экзоскелета, после чего рост затрудняется и останавливается. Периодическое сбрасывание кутикулярного покрова завершается по достижении имагинальной стадии. У некоторых насекомых число линек строго детерминировано и обычно невелико (до шести линек). У других --- число линек зависит от условий существования и достигает 20 (поденки) или даже 40 (платяная моль).

У *Hemimetabola* личинки имеют значительное сходство с *imago*, хотя и отличаются от взрослых форм размерами и отсутствием крыльев, зачатки которых, впрочем, появляются уже после первой линьки. Ювенильные формы (от лат. *juvenilis* --- юный) *Hemimetabola* называются *нимфами* (от греч. *νύμφα* -- девица, невеста) или (у веснянок, поденок, стрекоз) --- *наядами* (от греч. *ναϊαζ* --- нимфа вод). По мере развития нимфы растут и приобретают все характерные для *imago* признаки.

У *Holometabola* личинки резко отличаются от взрослых форм. Как правило, они имеют червеобразное тело. У некоторых видов личинки лишены ног, у других имеют только грудные ноги, личинки третьих обладают и грудными и брюшными конечностями. В отличие от нимф личинки *Holometabola* в процессе роста и развития сохраняют свой личиночный облик. Трансформация в этом случае происходит на стадии *куколки*, когда возникают специфические признаки взрослого животного с характерным членением тела, с конечностями и крыльями. Появлению взрослого животного предшествует последняя линька.

В ходе развития многие ткани личинки полиплоидизируются и при превращении личинки во взрослую особь замещаются диплоидными. Глубина метаморфоза личинок варьирует. Например, у многих мух и перепончатокрылых в ходе метаморфоза практически вся личиночная

гиподерма разрушается и замещается имагинальной. Разрушаются личиночные лабиальные железы. Радикальной перестройке подвергается мускулатура. Новый облик приобретает трахейная дыхательная система. Разрушение личиночных тканей происходит путем гистолиза и фагоцитоза. Активную роль в процессах метаморфоза играет апоптоз.

Построение новых органов взрослой особи происходит при участии специальных зачатков, так называемых *имагинальных дисков*, или особых резервных скоплений диплоидных имагинальных клеток --- гистобластов, входящих в состав функционирующих полиплоидных тканей личинки. Дифференциация имагинальных дисков и гистобластов начинается при получении соответствующего гормонального сигнала на стадии куколки, тогда как спецификация клеток происходит на стадии бластодермы. Характер спецификации клеток, образующих впоследствии имагинальные диски, зависит от положения этих клеток вдоль переднезадней и дорсо-вентральной осей. Эти детерминированные на образование дисков клетки практически не пролиферируют, однако на личиночной стадии клеточные деления возобновляются и, соответственно, происходит рост дисков. У Дрозофилы имеется десять основных пар имагинальных дисков и один непарный диск в задней области тела, идущий на построение репродуктивных органов животного. Наиболее крупный диск Дрозофилы --- имагинальный диск крыла содержит около 60 тысяч клеток, имагинальные диски ног или жужжалец --- примерно по 10 тысяч клеток.

Имагинальные диски закладываются у вылупившихся личинок в виде эпителиальных утолщений. Различают несколько типов дисков (рис. 9-32). Наиболее просто устроены наружный и свободный диски, располагающиеся непосредственно под кутикулой. Более сложно устроены погруженные диски. В этом случае гиподерма образует впячивание, погруженная часть которого образует собственно диск, соединенный с гиподермой периподиальным стебельком. На стадии куколки при действии гормона --- *экдистерона* происходит выворачивание имагинальных дисков наружу. При этом центральная часть диска телескопически выдвигается и образует дистальную

область органа. Периферическая часть диска дает проксимальную область конечности (рис. 9-33).

## ГЛАВА 10. DEUTEROSTOMIA. ИГЛОКОЖИЕ (ECHINODERMATA)

Третья ветвь билатеральных животных --- Вторичноротые, или Deuterostomia, были выделены как особая группа еще в начале двадцатого столетия на основании морфологических особенностей индивидуального развития. По современным представлениям, ко Вторичноротым относятся Иглокожие (Echinodermata), Полухордовые (Hemichordata) и Хордовые (Chordata). Основными отличительными признаками Вторичноротых ранее считались способ закладки ротового отверстия и ануса, а также особенности образования мезодермы. В отличие от Первичноротых (современные Lophotrochozoa и Ecdysozoa), у которых ротовым отверстием становится бластопор, у Вторичноротых рот закладывается независимо от бластопора. Бластопор у Вторичноротых превращается в анальное отверстие или в нервно-кишечный канал в задней области зародыша. Хотя имеется целый ряд отклонений от этого правила и судьба бластопора не может служить универсальной характеристикой Первично- и Вторичноротых, тем не менее, возникновение Deuterostomia связывают с такой перестройкой онтогенеза, при которой закладка рта развивающегося животного сдвигается вперед от бластопора по брюшной стороне (В.Н. Беклемишев, 1964). Поскольку поверхность зародыша замкнута, эта тенденция смещения закладки рта вперед могла привести к изменению положения рта, который с нейрогенной стороны должен был переместиться на противоположную, контрнейрогенную. Расположение рта на контрнейрогенной стороне тела, и те преимущества, которые получало животное при обращении ротового отверстия к донной поверхности, могли способствовать превращению контрнейрогенной стороны тела в вентральную область животного, обращенную по направлению к центру силы тяжести. Этот процесс некоторые исследователи рассматривают как своеобразную инверсию дорсо-вентральной оси взрослого животного, которая происходит в ходе эволюции хордовых животных (В.В. Малахов, 19NB;NB). Так или иначе, эволюция Вторичноротых связана с существенными изменениями дефинитивной полярности тела. Сравнительно с Первичноротыми закладка ротового отверстия у Вторичноротых смещается из вегетативной области в анимальную, а нейрогенная область зародыша становится у взрослых животных дорсальной.

Типичным для низших Вторичноротых признается *энтероцельный* способ образования мезодермы. В этом случае мезодерма закладывается в виде эпителиальных мешочков, которые обособляются от стенки архентерона. Типичным для Первичноротых считается *телобластический* принцип образования мезодермы. При этом мезодермальный зачаток образуется за счет пролиферации особых стволовых клеток --- мезотелобластов, коммитирование которых происходит на стадии дробления.

В действительности, у билатеральных животных имеются разнообразные способы формирования мезодермы. Мы видели, например, что у многих Членистоногих, мезодерма специфицируется в виде двух симметричных вентролатеральных полосок, расположенных вдоль длинной оси зародыша, которые погружаются вглубь зародыша, сохраняя эпителиальную структуру. Наоборот, у Позвоночных мезодерма образуется, главным образом, в результате иммиграции клеток зародышевой полоски. В наиболее отчетливом виде телобластический и энтероцельный способы образования мезодермы сохранились лишь у наиболее примитивных представителей, соответственно, Первично- и Вторичноротых.

### **10.1. Иглокожие**

Иглокожие представлены рядом ископаемых и современных классов. Среди последних --- морские лилии, морские звезды, морские ежи, офиуры и голотурии. Это донные обитатели морей --- сидячие или ведущие свободный образ жизни. Взрослые животные радиально-симметричные, обычно пятилучевые. Радиальную симметрию Иглокожие приобрели вторично, что находит свое отражение в процессе онтогенеза. На личиночных стадиях это типично билатерально-симметричные животные. Достижение дефинитивной стадии развития, однако, сопряжено с радикальным изменением типа симметрии. В ходе метаморфоза Иглокожих происходит коренная перестройка плана строения тела, в результате которой они превращаются в радиально симметричных животных.



Характерной особенностью Иглокожих является наличие биоминерального эндоскелета, представленного различного рода пластинками и иглами, лежащими в подкожной соединительной ткани. Другой особенностью иглокожих служит наличие амбулакральной, или водно-сосудистой, системы, которая обеспечивает локомоторную функцию органов движения.

Для Иглокожих характерно наружное оплодотворение. Дробление обычно полное, радиальное, завершающееся формированием подвижной целобластулы (рис.10-1). Два первых деления меридиональные, их плоскости проходят перпендикулярно друг другу. Третья борозда --- экваториальная. У многих иглокожих (морские звезды, голотурии) дробление равномерное. У морских ежей, начиная с четвертого цикла, дробление приобретает неравномерный характер, так как бластомеры анимального полушария делятся меридионально, тогда как вегетативная четверка делится широтной бороздой на мелкие вегетативные клетки и крупные, лежащие в экваториальной области. Таким образом, на стадии 16-и бластомеров образуются восемь анимальных мезомеров, за которыми следуют четыре макромера и, наконец, на вегетативном полюсе располагается четыре микромера (рис. 10-1 В). При следующем делении микромеры делятся на большие, прилегающие к макромерам, и малые микромеры, которые занимают вегетативную оконечность зародыша. Как обнаруживается в опытах с прижизненной маркировкой бластомеров, а также в опытах по изоляции бластомеров, мезомеры анимального полушария представляют собой зачаток эктодермы зародыша и по завершении дробления образуют жгутики.

Известный шведский исследователь Свен Херстадиус изолировал разные области зародыша морского ежа на стадии 64 клеток (Hörstadius, 1939). Из изолированных анимальных венцов бластомеров (рис. 10-2) возникали миниатюрные бластулоподобные зародыши, в составе которых были только эктодермальные клетки. Такие зародыши получили наименование "вечной бластулы", так как они активно плавали, но их развитие дальше не шло, гастрюляция не происходила, и никаких иных дифференцированных элементов кроме эктодермальных жгутиковых клеток не возникало. Клетки вегетативного полушария имеют более широкий круг производных, включая эктодерму,

энтодерму и мезодерму. При изоляции анимальных венцов вместе с вегетативными клетками развивались аномальные зародыши, но тем не менее с кишечником и элементами скелета.

Ведущая роль в спецификации клеток развивающегося зародыша морского ежа принадлежит микромерам. В частности, микромеры способны индуцировать образование энтодермы. Как было показано в экспериментах Герстадиуса, при объединении мезомеров анимальной половины с микромерами часть клеток презумптивной эктодермы превращалась в энтодермальный зачаток, и формировался плутеус. Роль микромеров в индукции энтодермы была продемонстрирована в опытах по пересадке микромеров на анимальное полушарие зародыша морского ежа на стадии 16-и клеток. После такой трансплантации у зародыша энтодерма возникала и на вегетативном, и на анимальном полюсах. Соответственно возникали две области инвагинации и формировались два архентерона (рис. 10-3).

Ранняя спецификация клеток в разных областях бластулы коррелирует с экспрессией разных генов, что позволило Эрику Дэвидсону выделить у зародышей морского ежа в конце дробления пять зон, каждая из которых экспрессирует свой уникальный набор генов (рис. 10-4) (Davidson, 1989, 1990, 1991). В числе этих зон: оральная эктодерма, аборальная эктодерма, крупные микромеры, дающие скелетогенные клетки; малые микромеры, производные которых образуют целомическую мезодерму; наконец, вегетативная пластинка, материал которой используется на построение кишечника и отчасти дает вторичную мезенхиму.

Формирование бластулы сопряжено с эпителизацией зародыша, в ходе которой возникают специализированные клеточные контакты, и начинается выработка наружного и внутреннего внеклеточного матрикса. В клетках бластулы образуется также особый фермент вылупления, благодаря которому облегчается разрыв желточной оболочки (оболочки оплодотворения) и выход активно плавающей бластулы в окружающую среду.

Для Иглокожих типична гастрюляция путем инвагинации эпителия вегетативной области бластулы. Вегетативная пластинка изгибается, образуя впячивание. Одновременно с изгибанием происходит инволюция или перемещение внутрь клеток, расположенных по периметру возникшего широкого blastopora. Благодаря этим двум процессам образуется относительно короткая и широкая первичная кишка --- архентерон (рис. 10-5). У морского ежа процесс инвагинации предваряется ингрессией (вселением) в полость бластулы первичной мезенхимы, клетки которой образуются из крупных микромеров. Первичная мезенхима представляет собой популяцию скелетогенных клеток, которые образуют кольцо и два симметричных скопления в вегетативной области, где и начинается формирование скелетных игл личинки.

Следующий этап гастрюляции обусловлен реаранжировкой клеток архентерона, в результате которой первичная кишка становится длинной и узкой (рис. 10-6). Из вершины архентерона у морского ежа выселяется вторичная мезенхима, клетки которой образуют длинные нитчатые отростки --- филоподии (от лат. *filum* --- нить; греч. *πούς*, *πόδοζ*--- нога). Полагают, что эти клетки соединяются при помощи своих отростков с архентероном и стенкой бластулы и за счет сокращения филоподий могут участвовать в растяжении архентерона. По-видимому, вторичная мезенхима участвует и в морфогенетических процессах, связанных с изгибанием первичной кишки в сторону будущей оральной области. При этом изгибании архентерона происходит его сближение с эктодермой личинки, которая инвагинирует и образует стомодеум. В области контакта образуется ротовое отверстие, тогда как первичный рот --- blastopore --- становится анусом личинки.

Одновременно с этим у морских ежей происходит сужение анимальной области гастрюлы и расширение вегетативной так, что личинка приобретает коническую форму (*стадия призмы*). На этой стадии становится отчетливой орально-аборальная ось (рис. 10-7). Бывшая вегетативная область с blastopore становится брюшной стороной личинки.

Если спецификация анимально-вегетативной оси зародыша, которая проявляется в образовании венцов эктодермы, энтомезодермы и скелетогенной

мезенхимы, обусловлена процессами, происходящими в период гаметогенеза, то положение орально-аборальной оси у морских ежей фиксируется уже после оплодотворения, на стадии дробления. Заметную роль в предопределении местоположения орально-аборальной оси играет, как оказалось, интенсивность окислительно-восстановительных процессов. Усиление окислительных процессов способствует формированию оральной области. Наоборот, подавление --- дает преимущество развитию аборальных структур. Асимметрия дыхательных процессов коррелирует с дифференциальной активностью гена *P3A2*, который служит негативным регулятором, репрессирующим ген *CyIIIa* в перспективной оральной эктодерме (Coffman, Davidson, 2001)

Непосредственно перед образованием ротового отверстия из состава первичной кишки выделяется целомическая мезодерма. Этот процесс у разных видов иглокожих протекает различно. Чаще всего целомический мешок возникает на вершине архентерона (непарный энтероцель), хотя иногда целомические мешки возникают как парное образование на боковых стенках первичной кишки. Непарный мешок личинки морского ежа (рис. 10-8) подразделяется на правый и левый *целомы*. Они, в свою очередь, делятся перешнуровками на передний, средний и задний отделы (соответственно --- *аксоцель*, *гидроцель* и *соматоцель*). На основе левых аксо- и гидроцеля происходит развитие амбулакральной системы животного. Левый аксоцель дает начало поровому каналу, а левый гидроцель в ходе развития приобретает форму пяти-лопастного диска и впоследствии формирует амбулакральное кольцо, основу водно-сосудистой системы взрослого животного. Правые аксо- и гидроцели часто дегенерируют, а соматоцели обычно образуют мезентерий и целомическую выстилку полости тела.

Развитие Иглокожих обычно имеет непрямой характер, хотя у многих видов развитие с личинкой может утрачиваться. При непрямом развитии после гастрюляции формируется личинка, которая затем проходит метаморфоз и превращается во взрослое животное.

Имеется два основных типа развития с личинкой: развитие с *планктотрофной* личинкой типа диплеврулы, которая питается за счет микроскопических

организмов планктона, и развитие с *лецитотрофной* личинкой, т.е. личинкой, имеющей большие запасы питательных веществ в виде желтка, синтезированного еще в период оогенеза в материнском организме. В первом случае личинки имеют разнообразные приспособления к пелагическому образу жизни. У морских звезд пелагическая личинка носит название *бипиннарии* (рис. 10-9), для голотурий характерны личинки *аурикулярии* (от лат. auricula --- мочка уха) (рис. 10-10). Для этих личинок характерно наличие разнообразных лопастей тела, по которым проходит ресничный шнур, основной локомоторный орган личинки. На более поздних стадиях, перед метаморфозом, у голотурий образуются *долиолярии* (от лат. doliolum --- бочонок) (рис. 10-11). У долиолярии нет извилистого ресничного шнура. Ее тело окаймлено четырьмя --- пятью ресничными кольцами. Долиолярии не питаются и претерпевают быстрый метаморфоз.

У морских ежей и офиур формируются так называемые *плутеусы* (от лат. pluteus --- стена из ивовых прутьев), соответственно --- *эхиноплутеусы* (рис. 10-12) и *офиоплутеусы* (рис. 10-13). Плутеусы обладают длинными, поддерживаемыми внутренним скелетом выростами --- руками ("ивовые прутья"), по периметру которых, окаймляя оральную поверхность личинки, проходит ресничный шнур.

При развитии с лецитотрофной личинкой независимо от таксономической принадлежности у иглокожих обычно образуются личинки типа долиолярии.

Метаморфоз у иглокожих животных --- сложный и, пожалуй, не имеющий аналогий морфогенетический процесс, в ходе которого происходит преобразования билатерального типа организации тела в радиальный. В настоящее время о механизмах этого процесса, в том числе и о его молекулярно-биологических основах, практически ничего не известно. Увлекательная расшифровка этого своеобразного явления еще лишь предстоит.

При метаморфозе у Иглокожих в теле билатеральной личинки образуется радиально-симметричный зачаток будущей дефинитивной формы, который называют имагинальным диском или имагинальным зачатком (рис. 10-14). У

морского ежа образование этого зачатка связано с перестройкой левого гидроцеля, который принимает форму пяти-лопастного диска. Другой составляющей имагинального зачатка служит впячивание эктодермы на левой же стороне тела личинки. Это впячивание называют амниотическим. Амниотическое впячивание иногда полностью отшнуровывается от поверхности тела в виде замкнутого мешочка, хотя у некоторых видов оно может сохранять связь с внешней средой. Утолщенная эктодерма, которая образует дно амниотической полости, в области пяти-лучевого гидроцеля также становится пятиугольной и представляет собой зачаток органов оральной области будущего животного. Во время метаморфоза на правой стороне личинки начинают формироваться органы аборальной области морского ежа. Одновременно происходит редукция личиночных органов, перестройка кишечника и развитие дефинитивного скелета.

## ГЛАВА 11. DEUTEROSTOMIA. НИЗШИЕ ХОРДОВЫЕ

### 11.1. Оболочники (Tunicata)

Оболочники представлены несколькими классами морских животных, среди которых имеются как сидячие формы (асцидии), так и пелагические (аппендикулярии, сальпы, долиолиды и пирсомы). Для Оболочников характерно образование *туники* --- особого покрова или оболочки тела, главным компонентом которой является туницин --- целлюлозоподобное вещество, секретируемое эпидермисом. Хорда в течение всей жизни сохраняется лишь у аппендикулярий. У асцидий хорда обнаруживается, как это впервые установил А. О. Ковалевский (1866, 1871), только на ранних этапах онтогенеза, а в ходе метаморфоза, когда личинка превращается во взрослое животное, хорда резорбируется. Обычно Оболочники характеризуются непрямым развитием, однако, у некоторых асцидий, а также у некоторых других Оболочников личиночная стадия выпадает, и возникает прямое развитие.

Проблема филогении Оболочников является предметом оживленной дискуссии. С учетом данных молекулярной биологии, основанных на изучении нуклеотидных последовательностей некоторых гомологичных участков ДНК, Оболочники предстают как монофилетическая группа, которая обособилась позднее Иголокожих, но раньше, чем возникли Головохордовые и Позвоночные (рис 11-1). Среди Tunicata первыми, согласно этим взглядам, обособились аппендикулярии. Линии, ведущие к Ascidiacea и Thaliacea (группа, которая представлена сальпами, боченочниками и огнетелками), разошлись позднее. Согласно этим взглядам, анцестральные Оболочники, по-видимому, имели организацию, напоминающую организацию аппендикулярий или личинок асцидий. Иной точки зрения придерживается О. М. Иванова-Казас (1995), согласно которой Бесчерепные обособились от эволюционного ствола, ведущего к позвоночным, раньше, чем Оболочники (рис. 11-2).

С конца 19-го столетия, когда экспериментально был показан детерминативный характер раннего развития асцидий, они становятся излюбленным объектом эмбриологических исследований. Этому способствовал ряд обстоятельств, в

том числе, легкость получения эмбрионального материала. Асцидии удобны для морфологической и экспериментальной работы, поскольку их зародыши и личинки отличаются сравнительно небольшим числом клеток, что позволяет проследить судьбу практически любого бластомера. Гастрюляция у асцидий начинается по достижении примерно ста клеток. Личинка асцидии насчитывает всего около 2,5 тысяч клеток, представленных шестью типами тканей. Асцидии привлекают внимание еще и потому, что у многих видов разные области яйца по-разному окрашены, и при дроблении эта, естественным образом маркированная, цитоплазма попадает в разные бластомеры. Это обстоятельство в сочетании с малым числом клеток и быстрым темпом развития (менее суток от оплодотворения до плавающей личинки) облегчает детальное исследование родословных разных клеточных линий. В наши дни обнаружилось еще одно привлекательное свойство асцидий как модельного объекта. Оказалось, что у асцидий сравнительно небольшой геном, а это существенно облегчает процедуру выделения и клонирования генов, контролирующих процессы развития.

Дробление у асцидий билатеральное. Уже первая борозда, которая проходит по меридиану через середину желтого серпа (рис. 11-3, Б,В), делит яйцо на две симметричные половины, так что миоплазма равномерно распределяется между левым, и правым бластомерами. Вторая борозда также меридиональная, но проходит под прямым углом к первой и делит зародыш на переднюю и заднюю половины. Миоплазма при этом остается в задних бластомерах (рис. 11-3). Третья борозда --- экваториальная. Она делит зародыш на анимальную и вегетативную половины, каждая из которых на этой стадии насчитывает по четыре клетки.

Для удобства описания клеточных родословных Конклином была введена система индексов, состоящая из двух литер (А и В), цифр и подчеркивания (Conklin, 1905). Литеры А предназначены для обозначения передних бластомеров, В --- для задних. Клетки анимального полушария обозначаются строчными литерами (a, b), а вегетативного полушария --- прописными (А, В). Индексы клеток правой половины зародыша подчеркиваются чертой снизу. Индексы левой половины остаются без подчеркивания. Цифра, следующая за



литерой, указывает номер генерационного цикла: яйцо --- первая генерация, два бластомера --- вторая, четыре бластомера --- третья и т.д. Вторая цифра, отделенная от первой точкой, обозначает номер клетки в данном квадранте зародыша: номера идут в определенной последовательности, а именно, от передних вегетативных к задним вегетативным, и далее от передних анимальных к задним анимальным. Эти номера являются "сквозными" для данного квадранта. Например, на стадии 16-и клеток в каждом квадранте имеется по четыре клетки, и вторая цифра индекса принимает значения 1, 2, 3, 4; на стадии 32 клеток --- от 1 до 8.

Первые два бластомера обозначаются как АВ2 и АВ2. На стадии 4-х клеток имеются две передние клетки А3, А3 и две задние В3 и В3. На стадии 8-и в вегетативном полушарии спереди расположены клетки А4.1 и А4.1, а сзади В4.1 и В4.1, тогда как в анимальном полушарии спереди расположены а4.2 и а4.2, а сзади b4.2 и b4.2. Итак, если клетка имеет, например, индекс В6.8, то это означает, что это клетка 32-клеточного зародыша (индекс 6;  $2^{(6-1)} = 32$ ), что она расположена в вегетативном полушарии слева (прописная литера, без подчеркивания), причем занимает крайнее заднее положение (8 - последний номер, т.к. на стадии 32-х клеток в каждом квадранте  $32:4=8$  клеток).

Изучение клеточных родословных позволяет построить карту презумптивных зачатков на разных стадиях развития. Так, эта карта, спроецированная на яйцо, показывает, какие области яйца дают в ходе дробления те или иные зачатки (рис. 11-4). Видно, что материал анимальной области яйца в процессе дробления попадает в бластомеры, дающие начало эктодерме личинки, тогда как цитоплазма вегетативной области --- в клетки будущей энтодермы. Судьба цитоплазмы экваториальной области различна. В будущей задней области расположен материал желтого серпа или миоплазма, связанная с дифференциацией мезенхимы и мускулатуры, а в будущей передней области лежит цитоплазма, которая войдет в состав бластомеров, дающих начало хорде и зачатку нервной системы.

Органообразующие области хорошо просматриваются и на стадиях дробления. Так, на стадии 32 бластомеров из 16 клеток анимального полушария 14 дают

впоследствии эктодерму. В вегетативном полушарии в центре расположены 6 богатых желтком бластомеров, потомки которых образуют энтодерму, имеется 6 бластомеров, содержащих миоплазму, и соответственно дающих начало клеткам-родоначальницам мезодермы, и, наконец, 4 клетки у переднего края --- зачаток хорды и нервной системы.

В результате дробления, которое завершается на седьмом цикле, возникает несколько уплощенная в анимально-вегетативном направлении бластула, не имеющая выраженной полости.

Следующий этап развития --- гаструляция --- у асцидий обеспечивается тремя скоординированными процессами перемещения клеток--- *инвагинацией*, *инволюцией* и *эпиболией* (рис. 11-5).

Инвагинация или впячивание затрагивает центральные клетки вегетативного полушария (зачаток энтодермы). Процесс инволюции, т.е. движение эпителиального пласта вглубь зародыша по поверхности других клеток, характерен для хордо-мезодермы, клетки которой лежат по периферии энтодермального зачатка. Инволюция начинается на переднем конце зародыша, где клетки зачатка хорды через переднюю губу бластопора перемещаются по остающейся на поверхности зародыша эктодерме. Распространяясь назад, инволюция захватывает расположенный латерально материал мезенхимы и, наконец, дойдя до заднего конца, вовлекает и мезодермальные клетки. Эти клетки, перемещаясь внутрь зародыша, формируют на его заднем конце зачаток мускулатуры хвоста личинки.

Эпиболия характерна для клеток эктодермы. Эктодермальные клетки уплощаются и обрастают клетки вегетативного полушария, формируя покров личинки. Одновременно происходит вытягивание зародыша вдоль переднезадней оси. При этом клетки нейрального зачатка принимают вид нервной пластинки, которая вытягивается вдоль медиальной оси зародыша, располагаясь над клетками зачатка хорды.

Следует обратить внимание на то, что у Асцидий презумптивная нейрогенная зона на стадии гастрюлы располагается в вегетативной области зародыша (рис. 11-6). Как по своему положению, так и по действующим в этой области молекулярно-генетическим механизмам спецификации нервной ткани нейрогенная зона *гомологична* соответствующей зоне Членистоногих. Эта гомология очевидна, несмотря на то, что область, где у Членистоногих формируется нервная цепочка, является предтечей брюшной стороны, а нейрогенная область Хордовых --- спинной стороны формирующегося животного. Во избежание путаницы мы должны осознать, что понятия «спинной» или «дорсальный» и «брюшной» или «вентральный» являются вторичными в применении к эмбриогенезу. Они заимствованы из терминологии, разработанной для дефинитивных форм, и характеризуют положение частей тела взрослого животного относительно оси гравитации. Например, под вентральной стороной зародыша можно понимать область, где формируются органы животного, обращенные к центру гравитации. Противоположная сторона будет дорсальной. При таком понимании терминов ротовое отверстие, хорда и нервная трубка у Оболочников формируются на дорсальной стороне тела (рис. 11-7).

Вопрос о том, почему структуры, закладывающиеся в вегетативной области зародышей, у Первичноротых становятся вентральными, а у Хордовых --- дорсальными, нельзя признать окончательно решенным. По-видимому, заслуживает внимания точка зрения, согласно которой существенной причиной сохранения этого изменения в эволюции животных могло быть перемещение закладки ротового отверстия на контранейрогенную сторону. Другим фактором морфогенеза, который должен был способствовать сохранению функциональной инверсии дорсальности у высших хордовых, возможно, было распространение зачатков хорды и нервной системы до самого переднего конца зародыша, которое стало возможным после указанного перемещения закладки ротового отверстия.

Вслед за гастрюляцией происходит *нейруляция* или процесс формирования нервной трубки. Суть нейруляции состоит в том, что нервная пластинка изгибается внутрь, образуя сначала желобок, который затем замыкается на

спинной стороне. Замыкание нервной трубки начинается на заднем ее конце и затем распространяется вперед. Небольшое отверстие, которое соединяет полость нервной трубки с внешней средой, *нейропор*, сохраняется на переднем конце зародыша до конца нейруляции. Передний конец нервной трубки расширяется и приобретает вид пузырька (чувствительный или церебральный пузырек). Из стенок пузырька образуются органы чувств личинки --- глаз и статолит. Задняя часть трубки дифференцируется как спинной мозг.

Формирование взрослой асцидии происходит в результате метаморфоза личинки (рис. 11-8), которая передним концом прикрепляется к субстрату и утрачивает хвост, мышцы и хорду.

## 11.2. Головохордовые или бесчерепные (Cephalochordata, Acrania)

Подтип головохордовых представлен небольшой группой животных, которая объединяет всего два семейства сравнительно мелких (до 6 см в длину) морских беспозвоночных. Отличительными особенностями Головохордовых служат следующие признаки: хорда простирается вдоль всего тела до самого переднего конца, выходя за пределы нервной системы; вокруг хорды не образуется ни хрящевого, ни костного скелета; отсутствует череп; головной мозг не дифференцирован; органы чувств развиты слабо: на переднем конце тела имеются обонятельная ямка и светочувствительное пигментное пятно, а также осязательные клетки в ротовых щупальцах и в коже; сердце и специальные органы дыхания отсутствуют. Мускулатура представлена двумя продольными латеральными лентами, подразделенными на несколько десятков (до 80) сегментов или миомеров. Множественные половые железы и выделительные органы расположены посегментно.

Типичным представителем подтипа является Ланцетник *Branchiostoma lanceolatum*, имеющий удлиненное, заостренное с обоих концов тело. Долгое время в литературе Ланцетник был известен как *Amphioxus* (от греч. ἀμφι--- оба, οξύς --- острый). Вдоль тела Ланцетника проходят дорсальный, вентральный и каудальный плавники.

Первоначально бесчерепные рассматривались как продукт регрессивной эволюции каких-то рыбообразных позвоночных, однако исследования эмбриологии и морфологии низших хордовых показали ошибочность такого взгляда. По мнению О. М. Ивановой-Казас, Acrania возникли как обособленная ветвь Первичнохордовых (Иванова-Казас, 1995) (рис. 11-2). Недавно было обнаружено ископаемое бесчерепное животное, жившее 520 млн. лет тому назад (средний кембрий), которое имеет большое сходство с ланцетником, что свидетельствует о независимом от позвоночных возникновении бесчерепных (Briggs et al., 1994). Против представления о бесчерепных, как о результате регрессивной эволюции, свидетельствуют и исследования системы Нох-генов ланцетника. Показано, что у представителей бесчерепных имеется лишь один кластер Нох-генов, тогда как эволюция позвоночных произошла на фоне дубликации кластеров Нох-генов, число которых у них достигает четырех. Тем не менее, по ряду молекулярно-биологических характеристик Бесчерепные стоят ближе к позвоночным, чем к асцидиям (рис. 11-1).

Эмбриональное развитие Ланцетника изучено детально. Оно привлекло внимание многих исследователей после того, как А.О. Ковалевский впервые дал подробное описание развития этого животного (1867, 1877) и обнаружил черты сходства с развитием иглокожих. Детальное морфологическое описание развития ланцетника принадлежит Е. Конклину (1932).

Яйца Ланцетника сравнительно бедны желтком и имеют в диаметре до 120 мкм. После оплодотворения периферическая цитоплазма, образует в области проникновения сперматозоида субэкваториальное скопление, которое имеет вид серпа. Это образование называют *мезодермальным* серпом. Положение мезодермального серпа соответствует задней области будущего животного. Нельзя не заметить, что процессы цитоплазматической сегрегации, предопределяющие спецификацию мезодермы и положение переднезадней оси животного аналогичны тому, что происходит в раннем эмбриогенезе асцидий. Эта аналогия подчеркивается и тем, что положение мезодермального серпа предопределяет также и ось билатеральной симметрии. Действительно, первая борозда дробления, которая проходит меридионально через середину мезодермального серпа, делит зародыш на симметричные левую и правую

половины. Как и у асцидий, у Ланцетника большая часть анимального полушария дает эктодерму и соответствует вентральной стороне будущего животного, тогда как большая часть вегетативного полушария идет на построение структур дорсальной стороны.

Дробление полное и, несмотря на рано возникающую билатеральность зародыша, внешне имеет радиальный характер (рис. 11-9). Вторая борозда проходит также меридионально, но под прямым углом к первой и делит зародыш на переднюю и заднюю половины. Третья борозда проходит экваториально и отделяет четыре анимальных бластомера, имеющих несколько меньшие размеры, чем вегетативные, что позволяет говорить о микромерах и макромерах. После седьмого деления дробление становится асинхронным. Клеточные циклы в разных областях формирующейся бластулы различаются своей продолжительностью. Наибольшей интенсивностью митотических делений отличаются клетки мезодермального зачатка. Проспективные эктодермальные клетки анимального полушария делятся более быстро, чем энтодермальные, занимающие центральную область вегетативного полушария.

После пятого деления дробления внешняя билатеральность зародыша утрачивается. В результате дробления образуется целобластула (рис. 11-10). Полость бластулы заполнена студенистым веществом, роль которого, возможно, связана с растяжением зародыша. Исследование судьбы клеток, занимающих разные области бластулы, позволило построить карту презумптивных зачатков на стадии дробления (рис. 11-11, Б). На вегетативном полюсе расположены относительно крупные клетки, дающие после гастрюляции начало энтодермальному зачатку. Сзади этот зачаток ограничен презумптивной мезодермой, клетки которой наследуют цитоплазму мезодермального серпа оплодотворенного яйца. Впереди от презумптивной энтодермы располагаются клетки, которые впоследствии образуют хорду и нервную ткань. Сравнение карт презумптивных карт ланцетника и асцидий убеждает в принципиальном сходстве пространственной организации зародышей представителей подтипа бесчерепных и подтипа оболочников (рис. 11-4, рис. 11-11).

Как и у асцидий, вегетативная область, занятая презумптивной энтодермой, сначала уплощается, а затем впячивается внутрь бластоцеля. Эта инвагинация эпителиального пласта обозначает начало гастрюляции (рис. 11-12). Инвагинация сопровождается инволюцией, в ходе которой перемещающиеся через край бластопора клетки вегетативной области попадают внутрь гастрюлы и, сохраняя эпителиальную структуру, движутся вдоль базальных частей клеток наружного слоя. Раньше всего начинается инволюция клеток зачатка хорды. Несколько позже инволюируют клетки, расположенные на границе латеральных губ бластопора, которые дают материал мезенхимы и латеральной мезодермы, а затем и мезодермальные клетки задней области. Характерной особенностью гастрюляции ланцетника является рост передней губы бластопора в заднем направлении. Растущая передняя губа бластопора, содержащая материал хордомезодермы и нейрального зачатка, прикрывает собой гастрюцель и формирует дорсальную стенку тела зародыша.

В результате инвагинации бластоцель уменьшается, а затем, и полностью вытесняется энтодермой, которая при этом приходит в соприкосновение с эктодермой, которая образуется за счет клеток анимального полушария. Клетки эктодермы снабжены ресничками, активность которых обеспечивает движение зародыша.

В результате гастрюляции зародыш Ланцетника становится двуслойным. Очевидно, что эти слои не являются однородными зародышевыми листками. Расположенная внутри зародыша первичная кишка имеет сложный состав (рис. 11-13). В ее дорсальной области расположены клетки, которые после обособления образуют зачаток хорды, простирающийся вдоль всего тела и расположенный непосредственно под нейроэктодермой. Дорсолатеральные области первичной кишки образуют симметричные складки или желобки, которые затем замыкаются и обособляются от архентерона в виде парных мезодермальных тяжей. В передней области они имеют вид трубок. Позднее мезодермальные тяжи подразделяются на отдельные сомиты (рис. 11-14).

После выделения материала хорды и зачатков мезодермы в составе архентерона остается презумптивная энтодерма, которая занимала вентролатеральные и

вентральную области первичной кишки. Замыкаясь в трубку, этот материал образует зачаток кишки личинки.

Вслед за гастрულიей происходит нейруляция, в течение которой формируется зачаток центральной нервной системы (рис.11-15). На начальных этапах нейруляции нейроэктодерма, занимающая дорсальное положение, утрачивает связь с эктодермальным пластом. При этом свободные концы эктодермального пласта получают возможность расти по поверхности нервной пластинки, в результате чего она и оказывается внутри зародыша. Латеральные концы нервной пластинки приподнимаются и образуют желобок, смыкающийся позднее вдоль дорсальной линии в трубку. На переднем конце полость нервной трубки некоторое время сообщается с внешней средой с помощью *нейропора*, тогда как на заднем --- образуется нервно-кишечный канал, связывающий полость нервной трубки с полостью архентерона.

Сопоставление гастрულიи и нейруляции у Ланцетника и асцидий обнаруживает большое сходство в организации этих процессов.

Формирование личинки имеет целый ряд интересных особенностей, значение которых продолжает оставаться неразгаданным. Так, ротовое отверстие закладывается асимметрично на левой стороне тела. Асимметрично (на правой стороне) закладываются и жаберные щели. Восстановление билатеральной симметрии происходит лишь на стадии метаморфоза. Некоторые исследователи придают наблюдаемой асимметрии закладки органов филогенетическое значение, усматривая в ней исторические свидетельства происхождения Бесчерепных животных.



## ГЛАВА 12. НИЗШИЕ ПОЗВОНОЧНЫЕ (ANAMNIA)

Отличительной особенностью позвоночных служит внутренний скелет, представленный у зародышей хордой, а у взрослых животных хрящевым или костным позвоночником, состоящим из позвонков. Верхние дуги позвонков образуют особый канал, в котором расположен спинной мозг. Нервная система выдвигается вперед относительно хорды. На переднем конце позвоночник сочленен с черепом, в котором расположен головной мозг и органы чувств --- органы зрения, слуха и обоняния. Имеется сердце. Органы дыхания представлены жабрами у водных животных и легкими у наземных.

Среди позвоночных различают бесчелюстных (Agnatha) и челюстноротых (Gnathostomata). Первые не имеют дифференцированных челюстей. Вторые имеют челюстной аппарат, сочлененный с черепной коробкой. К Agnatha принадлежат круглоротые (миноги, миксины). К челюстноротым относятся два класса рыб --- хрящевые и костные рыбы, а также земноводные, пресмыкающиеся, птицы и млекопитающие.

Эволюция онтогенеза позвоночных животных ознаменовалась изменением, имевшим глобальное значение, а именно возникновением зародышевых оболочек и, прежде всего, амниона. Возникновение амниона и других зародышевых оболочек открыло перед позвоночными новые горизонты. Сделав их размножение независимым от водной среды, оно создало необходимые предпосылки для широкого освоения суши и таким образом открыло новые перспективы для эволюции животного мира.

С учетом этого изменения индивидуального развития позвоночные подразделяются на два надкласса. Высшие позвоночные --- рептилии, птицы и млекопитающие объединяются в надкласс Amniota, т.е. в группу животных, зародыши которых имеют амнион, особую зародышевую оболочку, создающую водную среду для развивающегося эмбриона. Бесчелюстные позвоночные, а также рыбы и земноводные образуют надкласс Anamnia, представители которого не имеют амниона.

У низших позвоночных различают два основных типа развития: более примитивное развитие с полным дроблением (круглоротые, двудышащие рыбы, хрящевые ганоиды, костные ганоиды, кистеперые, амфибии) и развитие с дискоидальным дроблением, которое возникает у животных, яйца которых отличаются высоким содержанием желтка (костистые рыбы, сельхозии). В качестве примеров развития *Anamnia* с полным дроблением рассмотрим развитие миноги (Круглоротые) и некоторых амфибий. Развитие *Anamnia* с дискоидальным дроблением будет рассмотрено на примере костистых рыб.

### **12.1. Круглоротые. Минога.**

Дробление яйца миноги полное, неравномерное. Первые две борозды меридиональные. Третья борозда проходит в широтной плоскости и делит яйцо на микромеры анимального полушария и богатые желтком макромеры вегетативного. В результате дробления образуется целобластула. Бластула миноги, отличается от бластулы низших хордовых своей многослойностью, что характерно для всех позвоночных. В анимальном полушарии стенка бластулы миноги состоит из двух-трех слоев, а в вегетативном полушарии --- из шести-семи слоев. Гастрюляция имеет принципиальное сходство с гастрюляцией Ланцетника, однако приобретает своеобразные черты, обусловленные особенностями строения многослойной бластулы. У миноги имеется передняя губа бластопора, но сколько-нибудь заметной инвагинации не происходит. В результате ингрессии клеток передней губы бластопора формируется узкий щелевидный гастрюцель. Вслед за этим за счет размножения, но, главным образом, вследствие интеркаляции смещающихся в медиальном направлении клеток, образующих спинную губу, она растет в заднем направлении, прикрывая при этом не гастрюцель, как у ланцетника, а энтодермальный зачаток, образованный клетками вегетативного полушария (рис. 12-1).

На карте презумптивных эмбриональных зачатков миноги на стадии бластулы, видно, что их расположение, по существу, не отличается от картины, наблюдаемой у ланцетника (рис. 12-2). Перед спинной губой бластопора расположены клетки, которые впоследствии дифференцируются как клетки хорды, впереди от презумптивной хорды расположена зона нейроэктодермы;

латеральные и вентральная губы бластопора окружены материалом, дающим начало мезодерме. Центральная область вегетативного полушария занята клетками презумптивной энтодермы, тогда как анимальное полушарие занимают эктодермальные клетки.

Боковые и задняя губы бластопора образуются на завершающей стадии гастрюляции, окончательно закрывая зачаток энтодермы. Дальнейшее развитие состоит в дифференциации нервной трубки, хорды, мезодермы и кишечника.

## 12.2. Амфибии

Амфибии, и прежде всего некоторые лягушки и тритоны, представляют собой излюбленный объект биологии развития. Легко доступные исследователю, обладающие довольно крупными яйцами, неприхотливые при содержании представители этого класса животных стали объектом разнообразных экспериментальных, в том числе микрохирургических исследований, которые внесли существенный вклад в понимание таких фундаментальных проблем морфогенеза, какими являются эмбриональная индукция и детерминация осей животного.

Амфибии представлены тремя отрядами, а именно, Безногими (Apoda), Хвостатыми (Urodela) и Бесхвостыми (Anura). Вопрос о монофилетическом или полифилетическом происхождении Амфибий остается открытым. Эмбриональное развитие Безногих практически не изучено. В развитии Хвостатых и Бесхвостых имеются существенные различия, хотя принципиальная схема развития является общей для них.

Из Бесхвостых модельными объектами биологии развития стали южноафриканская шпорцевая лягушка *Xenopus laevis* и, в меньшей мере, представители родов *Rana* и *Bufo*. Среди хвостатых наибольшей популярностью пользуются аксолотль *Ambystoma mexicanum*, японский тритон *Synops pyrrohogaster* и европейский тритон *Pleurodeles waltl*.

Яйца амфибий телобластического типа, с повышенной концентрацией желтка в вегетативном полушарии (рис. 12-3). Кортикальный слой анимального

полушария у многих лягушек сильно пигментирован. После оплодотворения происходит кортикальная ротация, в ходе которой кортекс яйца поворачивается примерно на  $30^\circ$  по меридиану, проходящему через точку вхождения сперматозоида, которая находится в анимальном полушарии. Вследствие вращения кортикального слоя становится видимой скрытая ранее серая цитоплазма анимального полушария: образуется так называемый серый серп (рис. 12-4).

Кортикальная ротация представляет собой очень важное событие в развитии амфибий, так как она обуславливает перемещение и активацию ряда морфогенетических факторов и предопределяет положение осей зародыша. Серый серп расположен на будущей спинной стороне зародыша и обозначает место, где начнется образование спинной губы бластопора. Плоскость меридиана, который проходит через середину серого серпа, представляет сагиттальную плоскость зародыша.

Дробление синхронное, полное, но неравномерное. Первые две борозды проходят меридионально и перпендикулярно друг другу, причем первая борозда проходит через середину серого серпа и, таким образом, как это описано у асцидий и ланцетника, делит яйцо на симметричные правую и левую части (рис. 12-5). Третья борозда --- широтная или латитудинальная (от лат. *latitudo* --- географическая широта), проходит в плоскости, параллельной экваториальной, и отделяет анимальные бластомеры меньших размеров от крупных вегетативных (рис. 12-5). В результате последующих четвертого меридионального и пятого широтного деления образуется стадия 32 бластомеров. В процессе дробления кортикальная цитоплазма, сопровождающая борозды дробления, частично перемещается вглубь зародыша, что ведет к новым связям между основными компонентами яйца. На двенадцатом клеточном цикле наступает момент, --- так называемая точка перехода на стадии средней бластулы (MBT point), когда синхронность дробления нарушается.

В процессе дробления образуется полость --- бластоцель. У амфибий бластоцель содержит жидкость, концентрация солей которой на порядок выше

концентрации солей окружающей среды. Бластоцель расположен в анимальном полушарии (рис. 12-6). Крыша бластоцеля состоит из нескольких рядов клеток. Вегетативное полушарие образовано крупными, богатыми желтком клетками, среди которых имеются и первичные половые клетки.

При рассмотрении карты презумптивных зачатков амфибий обращает на себя внимание ее принципиальное сходство с соответствующими картами миноги, ланцетника и асцидий (рис. 12-7). В центре вегетативной области здесь также расположены клетки, которые при дальнейшем развитии дают зачаток энтодермы. Впереди от клеток энтодермы лежат клетки будущей головной кишки и хорды. Еще далее вперед, в зоне, расположенной в основном в анимальном полушарии, расположены клетки, которые формируют нервный зачаток.

Вместе с тем нетрудно заметить и существенное отличие карты презумптивных зачатков амфибий от соответствующих карт круглоротых и низших хордовых. И это отличие касается прежде всего презумптивного нейрального зачатка, большая часть которого у амфибий перемещается на анимальную половину зародыша. Смещение нейрогенной зоны в анимальное полушарие, возможно, коррелирует с прогрессивным развитием нервной системы в ряду «низшие хордовые --- низшие позвоночные», и создает предпосылки для вовлечения в процесс нейрогенеза большего числа клеток.

Отношение между положением нейрального зачатка и основной осью зародыша варьирует у Хвостатых и Бесхвостых: у аксолотля нейрогенная зона распространяется практически до самого анимального полюса, тогда как у шпорцевой лягушки граница нейрального зачатка отстоит от анимального полюса примерно на  $45^{\circ}$  (рис. 12-8).

Гастрюляция у амфибий благодаря развитию массивного энтодермального зачатка представляется еще более сложным процессом, чем у круглоротых. Первым признаком начавшейся гастрюляции служит появление спинной губы бластопора, которая возникает на дорсальной стороне в маргинальной области, разделяющей бластулу на анимальное и вегетативное полушария. Спинная губа

бластопора возникает в виде небольшой дугообразной щели, врезающейся в поверхность зародыша в области серого серпа (рис.12-9, 12-10). Появление этого щелевидного углубления обусловлено сокращением апикальных концов, удлинением тела и расширением базальных областей лежащих здесь клеток энтодермального зачатка. Благодаря указанным изменениям клетки приобретают бутылковидную форму (рис. 12-11, В). Процесс, связанный с таким преобразованием формы клеток, распространяется по окружности в латеральном направлении и --- позднее --- назад, вызывая появление, соответственно, и латеральных и вентральной губ бластопора..

Гастрюляция завершается погружением энтодермального зачатка, клетки которого оказываются прикрытыми наружным листком в результате нарастания или эпиболии эктодермы. Эпиболия у амфибий связана с перестройкой или реаранжировкой многорядной стенки бластулы. Клетки более высоко лежащих рядов встраиваются в нижележащий пласт, протяженность которого при этом увеличивается (рис 12-11, А). В ходе такой реаранжировки клетки наружного ряда, лежащие впереди спинной губы бластопора, уплощаются, стенка бластулы становится тоньше, а клеточный пласт движется в направлении к бластопору.

В области бластопоральной щели слой наружных клеток инволюирует или подворачивается внутрь зародыша. Попавшие внутрь клетки продолжают мигрировать по внутренней поверхности стенки бластулы, перемещаясь теперь в обратном направлении к анимальному полюсу. Это движение обусловлено конвергенцией или стягиванием внутренних клеток маргинальной зоны к медиальной линии. В результате стягивания клеток в более узкую полосу происходит ее растяжение или удлинение в переднем направлении (12-11, Б). Благодаря этим процессам бутылковидные клетки и архентерон в целом перемещаются в сторону анимального полюса, оттесняя бластоцель к вентральной стороне зародыша. В отличие от схем прежних лет, которые широко распространены в учебной литературе, в настоящее время признается, что полость архентерона, в том числе и его крыша, выстлана энтодермой.

Процессы, которые начинаются на спинной стороне зародыша, постепенно распространяются латерально и назад, что приводит к образованию на поверхности зародыша кольцевого бластопора, в центре которого долгое время сохраняются занимавшие вегетативный полюс богатые желтком клетки энтодермального зачатка: так называемая желточная пробка.

Значение отдельных элементов морфогенетических движений у разных видов амфибий заметно варьирует. В частности, у некоторых хвостатых амфибий и у лягушки *Rana pipiens* движущей силой гастрюляции служит направленная миграция клеток, тогда как у *X. laevis* образование архентерона может происходить и в отсутствие миграции клеток.

После гастрюляции основные зачатки принимают следующее расположение. Поверхность гастрюлы образована эктодермой, вентральная область которой впоследствии становится эпидермисом зародыша, а дорсальная дифференцируется как нейральная ткань. Непосредственно под эктодермой в дорсальной области лежит дорсальная мезодерма, которая без резких границ переходит в латеральную и --- далее --- в вентральную мезодерму. Полость архентерона образована энтодермой: крыша архентерона однослойна, тогда как его дно сформировано массивным зачатком, состоящим из крупных богатых желтком клеток.

Нейроэктодерма дорсальной области представлена столбчатыми клетками, которые образуют нервную пластинку, лежащую непосредственно над зачатком хорды. У хвостатых амфибий клетки нервной пластинки, граничащие с эпидермисом, сильно вытягиваются в высоту, сокращаясь при этом на вершинах. Края нервной пластинки приподнимаются в виде складок. Эти складки растут в сагиттальном направлении и смыкаются по срединной линии зародыша. В области смыкания складок эпидермальные слои левой и правой стороны зародыша соединяются в непрерывный пласт покровного эпителия, а нейроэктодерма складок замыкается в нервную трубку. При этом часть материала нервных складок обособляется в виде нервного гребня (рис.12-12), клетки которого обладают широкими потенциями и, мигрируя в разные части тела, дифференцируются в разнообразные структуры. У бесхвостых нервная

пластинка состоит из поверхностного слоя и внутреннего --- сенсорного. Нервная трубка у них образуется только за счет клеток сенсорного слоя (рис. 12.2-11).

Процесс образования нервных валиков начинается в головной области и последовательно распространяется в заднем направлении. Скорость сближения нервных валиков различна вдоль переднезадней оси зародыша. Максимальная скорость характерна для средней области. Благодаря этому замыкание нервной трубки сначала происходит в средней части тела и из этой области распространяется вперед и назад. Как и у низших хордовых, у амфибий на переднем конце образуется нейропор, связывающий полость нервной трубки с внешней средой, а задние концы замыкающихся нервных валиков образуют свод, который прикрывает бластопор, который таким образом превращается в нервно-кишечный канал.

Механизмы удлинения нервной пластинки у Хвостатых и Бесхвостых, по-видимому, также различны. Во всяком случае в условиях органной культуры однослойная нервная пластинка *A. mexicanum* растет в длину только при наличии зачатка хорды, тогда как у *X. laevis* удлинение многорядной нейроэктодермы происходит и в отсутствие хорды за счет механизма конвергенции и растяжения.

Возникновение механизмов формообразования головы с обособленным головным мозгом, органами чувств и челюстями --- органами, которые сделали возможным и многократно интенсифицировали активное питание, стало важнейшей вехой в эволюции животных. Возникновение этих механизмов, естественно, в сочетании с другими преобразованиями онтогенеза, открыло новые пути эволюции позвоночных, которые привели к появлению рыб, амфибий, рептилий, птиц и млекопитающих. Указанием на эволюционную новизну краниогенеза может, видимо, служить то обстоятельство, что принципиальная схема развития головы заметно отличается от схемы развития туловища.



Головной мозг у амфибий возникает из широкой передней части нервной пластинки. Рядом перетяжек головной мозг подразделяется на три главных отдела --- передний (prosencephalon), средний (mesencephalon) и задний (rhombencephalon) мозг (рис. 12-14). Передний мозг вскоре после своего обособления подразделяется на две области --- лежащий впереди конечный мозг (telencephalon) и расположенный непосредственно за ним --- промежуточный мозг (diencephalon), который сзади граничит со средним мозгом. Конечный мозг подразделяется билатерально, образуя симметричные левое и правое полушария и лежащие впереди от них обонятельные доли. У амфибий полушария головного мозга развиты слабо. Промежуточный мозг дает начало глазным пузырям, гипоталамусу и нейральной части гипофиза, этого важнейшего органа внутренней секреции.

Развитие глаза амфибий стало классической моделью экспериментальной эмбриологии после того, как Шпеманн обнаружил зависимое развитие структур глаза, обусловленное индукционными взаимодействиями (см. том 2). Зачатки глаз возникают в виде глазных пузырей --- симметричных выростов, связанных с промежуточным мозгом глазным стеблем. Вначале короткий и широкий глазной стебель по мере развития глаза становится длинным и узким. Глазные пузыри растут в дистальном направлении и достигают эктодермы зародыша. Эктодермальные клетки в области контакта с глазным пузырем становятся столбчатыми и образуют так называемую хрусталиковую плакоду (от греч. *πλακοῦς*--- лепешка, пирожок) (рис. 12-15). Обращенная к плакоде стенка глазного пузыря инвагинирует в первичную полость глаза и образует двухслойную чашу --- глазной бокал (рис. 12-16). Внутренний листок глазного бокала представляет собой зачаток сетчатки, а наружный листок --- зачаток пигментного эпителия. Хрусталиковая плакода также инвагинирует и образует пузырек, который затем отшнуровывается от покровной эктодермы (рис. 12-15).

В процессе формирования глазной чаши первичная полость глаза исчезает, так как ее листки тесно смыкаются, хотя и не срастаются друг с другом. Снаружи глазной бокал окружается мезенхимными клетками, которые впоследствии дают начало сосудистой оболочке и склере глаза. Кожный эпителий в области зачатка глаза, после обособления материала хрусталика дает начало роговице.

Важное значение в развитии позвоночных животных имеют клетки нервного гребня, удивительная популяция клеток эктодермального происхождения, дающая необычайно широкий спектр производных. Возникая на стыке эпидермального и нейрального эпителиев, эти клетки в момент смыкания нервных складок и образования нервной трубки теряют эпителиальную структуру и активно мигрируют, иногда на весьма значительные расстояния. Среди производных нервного гребня имеются разного рода пигментные клетки, спинальные ганглии, ганглии вегетативной нервной системы, клетки глии, Шванновские клетки, клетки эндокринных желез, мезенхима и соединительная ткань, хондробласты, одонтобласты.

Особую роль играют клетки нервного гребня переднего отдела нервной трубки, дающего головной мозг. Действительно, они дифференцируются не только как элементы сенсорной нервной системы (тройничный, лицевой, языкоглоточный, блуждающий ганглии), не только как парасимпатические ганглии, но и как скелетогенные элементы, за счет которых строится большая часть черепа. После замыкания нервной трубки наблюдается три основных потока миграции клеток нервного гребня --- мандибулярный, гиоидный и жаберный (рис.12-17). Эта миграция столь интенсивна, что на стадии поздней нейрулы массу мигрирующих клеток можно наблюдать прижизненно по вздутиям эктодермы. Самый передний (мандибулярный) поток образуется клетками гребня, расположенного в среднем мозгу. Мандибулярный поток огибает зачатки глаз и устремляется вперед, окружая ротовое отверстие. Эти клетки формируют переднюю часть нейрокраниума и хрящи челюстей. Гиоидный поток образуется в зоне, расположенной впереди слухового пузырька и образует хрящ, подстилающий дно рта. В области, лежащей за слуховым пузырьком, идет миграция клеток, которые образуют жаберные дужки. У головастика образуются четыре жаберные щели, через которые вода выводится из глотки наружу. Жаберные дужки связаны с образованием наружных жабер, которые сохраняются у хвостатых амфибий, а у бесхвостых заменяются на внутренние жабры.

Широкое участие клеток краниального нервного гребня в формировании хрящевого черепа рассматривается как свидетельство в пользу гипотезы о том, что голова позвоночных возникла как эволюционное новообразование, дополнившее план тела протохордат (Gans, Northcutt, 1983). Реализация этого новообразования, как можно полагать, оказалась возможной благодаря тому, что клетки краниального нервного гребня вопреки своей, казалось бы, эктодермальной природе приобрели способность стать новым источником хряща, который заменил отсутствующий в краниальной области традиционный источник скелетогенной мезодермы --- сомиты.

После завершения нейруляции зародыши амфибий приобретают общий для всех позвоночных план строения тела (рис. 12-18), характерный для стадии *фарингулы*, т.е. стадии, на которой происходит образование жаберных щелей, лежащих по обе стороны глотки (pharynx).

Под эпидермальным эпителием находится нервная трубка, которая преобразуется в спинной мозг, и нервный гребень туловища. В отличие от краниального отдела клетки нервного гребня туловища не способны к хондрогенезу. Под нервной трубкой расположена хорда, проходящий вдоль всего тела опорный стержень, образованный вакуолизированными клетками. Вентральнее хорды проходит аорта. По обе стороны от нервной трубки и хорды располагается *параксиальная мезодерма*. В ходе развития эта мезодерма сегментируется на метамерно расположенные сомиты. Каждый сомит подразделяется на склеротом, дерматом и миотом. Клетки склеротома дифференцируются как хондробласты и дают начало хрящам осевого скелета животного. Дерматом служит источником развития соединительной ткани дермы. Миотом представляет собой зачаток поперечно-исчерченной мускулатуры.

Вентральнее миотома по обе стороны от энтодермальной кишки располагаются мезодермальные боковые пластинки. Латеральная мезодерма образует целомическую полость тела и подразделяется на внешний, лежащий под покровным эпителием, *париетальный листок* (соматическая мезодерма) и внутренний, граничащий с кишкой, *висцеральный листок*) спланхническая

мезодерма. Париетальный листок вместе с эпидермисом называют соматоплеврой, а висцеральный листок вместе с энтодермальным эпителием --- спланхноплеврой. Париетальный листок служит источником поперечно-исчерченной мускулатуры, а висцеральный листок --- источником гладкой мускулатуры и мезентерия. Между сомитами, представляющими дорсальную часть мезодермы (эпимер), и боковой пластинкой (гипомер) расположена промежуточная мезодерма (мезомер). Промежуточная мезодерма служит источником формирования половой и выделительной системы, которая у амфибий представлена на разных стадиях пронефросом и, позднее, мезонефросом.

**Развитие конечности.** Как у всех Tetrapodia конечности у амфибий закладываются в виде четырех зачатков (рис. 12-19). Первым признаком закладки конечности служит скопление мезенхимы, которая образуется за счет выселения отдельных клеток из париетального листка боковой мезодермальной пластинки. Вскоре это скопление становится видимым с внешней стороны в виде --- сначала --- небольшого вздутия, которое постепенно, по мере накопления мезенхимы, увеличивается в размерах и становится почкой конечности. Другим источником мезенхимы почки конечности служат сомиты. Выселяющаяся из сомитов мезенхима впоследствии образует мышечные элементы конечности, тогда как мезенхима париетального листка дает хондрогенные клетки. Наконец, третьим источником мезенхимы служат клетки нервного гребня. Потомки этих клеток дают начало соединительной ткани конечности.

**Развитие сердца.** Сердце образуется из мезодермы, которая на стадии гастрюлы лежит по обе стороны прехордальной пластинки. Сердце закладывается на вентральной стороне зародыша впереди от печеночного выроста кишки. Внутренний слой сердца, или *эндокард*, образуется из клеток мезенхимы, как элемент кровеносной системы, которая формируется путем преобразования мезенхимы в эндотелий кровеносных сосудов. Трубчатый эндокард спереди переходит в артериальные, а сзади в венозные сосуды. Вентральные края симметричных левого и правого спланхнотомов растут навстречу друг другу и срастаются по медиальной линии, образуя общую полость (рис.12-20).

Висцеральный листок спланхнотома образует по медиальной линии своего рода желоб, в который погружена трубка эндокарда. Позднее верхние края этого желоба смыкаются над эндокардом. Этот внешний по отношению к эндокарду мезодермальный слой при дальнейшей дифференциации образует сердечную мышцу или *миокард*. Parietalный листок спланхнотома преобразуется в *перикард*, внешнюю оболочку сердца, ограничивающую околосердечную полость (рис. 12-20).

**Метаморфоз.** У подавляющего большинства видов амфибий развитие имеет непрямой характер. В процессе эмбриогенеза образуется личинка, ведущая водный образ жизни. Позднее, однако, происходит превращение личинки в животное, которое способно жить не только в водной среде, но и на суше. Это радикальное изменение морфологии и физиологии животного называют метаморфозом.

Метаморфоз затрагивает все системы органов. У бесхвостых амфибий резорбируется главный орган движения личинки --- хвост с его мощной мускулатурой. У хвостатых амфибий изменения хвоста выражены слабее (рис.12-21). В процессе метаморфоза происходит усиленный рост конечностей. Редуцируются жабры, жаберные щели и жаберная крышка. У взрослого животного дыхательную функцию берут на себя легкие и кожа. Из жаберных щелей сохраняется только первая пара, которая преобразуется в среднее ухо (барабанную полость). Происходит перестройка скелета, в ходе которой хрящевые элементы замещаются костными. Ускоряется рост конечностей. Увеличиваются верхняя и нижняя челюсти. Серьезные изменения происходят в пищеварительной системе: относительная длина спирально свернутого кишечника растительноядного головастика уменьшается, при этом кишечник изменяет свою дифференцировку, обеспечивая плотоядный характер питания взрослого животного. В ходе метаморфоза личинки происходит смещение глаз из латерального положения в переднее, что создает предпосылки для бинокулярного зрения.

Метаморфоз представляет собой чрезвычайно интересную модель процессов развития, сочетающая процессы деструктивного и конструктивного

морфогенеза. Важную роль в процессах деструкции играют апоптоз и фагоцитоз. Молекулярно-биологические механизмы морфогенетических событий метаморфоза практически не изучены.

Сложная и скоррелированная совокупность изменений, происходящих в период метаморфоза, инициируется гормонами щитовидной железы --- *трийодтиронином* и, в меньшей степени, *тироксинами*, секреция которых находится под контролем гипоталамуса, а также зависит от гипофизарного гормона --- *пролактина*, наличие которого тормозит выработку трийодтиронина.

У видов, яйца которых содержат большое количество желтка, описано прямое развитие без свободноживущей личинки. При прямом развитии тем не менее образуются многие личиночные органы, такие как жаберные щели и наружные жабры, которые заменяются дефинитивными органами в эмбриональном периоде, т.е. до вылупления молодого животного из яйцевых оболочек.

### **12.3. Развитие костистых рыб (Teleostei)**

Рассмотрение филогенетического древа рыб убеждает в том, что наблюдаемые у низших позвоночных два типа развития, которые определяются объемом и, возможно, плотностью запасаемого в яйце желтка, возникают независимо в разных ветвях древа (рис.12-22). Трудно сказать, является ли случайностью или закономерностью тот факт, что богатые желтком яйца, которые обуславливают дискоидальный тип дробления, характерны для процветающих ныне селахий и костистых рыб, тогда как полное дробление типично для современных двудышащих, кистеперых, хрящевых ганоидов, костных ганоидов, т.е. для классов, имеющих весьма ограниченное число видов.

При описании развития костистых рыб акцент будет сделан на особенностях эмбриогенеза *Danio rerio*, в англоязычной литературе известной как zebrafish. *D. rerio* за последние десять-пятнадцать лет стала модельным объектом молекулярной биологии развития. Этому способствовала интенсивная разработка проблем генетики Данио, выявление и идентификация

разнообразных мутаций, затрагивающих ранние этапы онтогенеза. Немаловажную роль имели и некоторые особенности биологии этой рыбы: Данио прекрасно размножается в лабораторных условиях, имеет относительно короткий период достижения половозрелости, икринки достаточно крупные и прозрачные, что позволяет вести непосредственное наблюдение за развитием и его аномалиями.

Размеры ооцитов у рыб, в целом, находятся в обратной зависимости от количества половых продуктов, выметываемых самкой: наименьшие размеры ооцитов характерны для видов с высокой продуктивностью женских гамет. Имеется определенная зависимость между размерами икринок и стадией, на которой происходит вылупление личинки. У видов с крупными ооцитами вылупляются мальки, близкие по форме взрослым формам. У видов с мелкими ооцитами, напротив, вылупляются скорее личинки, которые существенно отличаются от взрослых форм.

Яйцо рыб окружено первичной по своему происхождению лучистой оболочкой (*zona radiata*), часто имеющей довольно сложную структуру и радиальную исчерченность. Эта исчерченность обусловлена наличием многочисленных микроканалцев. В период оогенеза в каналцы *zona radiata* заходят микроворсинки ооцита и фолликулярных клеток, что обеспечивает транспортировку питательных веществ в ооцит. У некоторых видов рыб кроме *zona radiata* образуются также вторичные и третичные оболочки. Например, у видов с придонным икрометанием яиц имеется вторичная студенистая оболочка (А.С. Гинзбург, 1968). Яйцевая оболочка рыб непроницаема для спермиев. Для их проникновения служит особое отверстие --- *микропиле* (от греч.  $\mu\kappa\rho\sigma$  --- малый;  $\pi\upsilon\lambda\eta$  --- проход).

Яйца костистых рыб имеют ярко выраженный телolecитальный характер. Почти вся цитоплазма сосредоточена на периферии яйца. После оплодотворения цитоплазма стягивается в анимальную область, где расположено ядро, образуя здесь *цитоплазматический бугорок* или *бластодиск*. Вегетативная часть ооцита занята плотной желточной массой, в которую вкраплены жировые включения (рис.12.3-2).

Дробление яйца дискоидальное, при котором борозды затрагивают только бластодиск. Первые четыре деления обычно меридиональные (рис. 12.3-3). На стадии 16 бластомеров лишь четыре центральные клетки обособлены от желтка, тогда как бластомеры, лежащие по периферии диска, сохраняют связь с желтком (рис. 12.3-4). Позднее начинаются деления, плоскость которых проходит в широтном направлении. Начиная с этой стадии зародыш состоит из наружных и внутренних клеток. Последние сохраняют связь с желтком (рис. 12.3-4). Наличие непосредственной связи между бластомерами и между бластомерами и желтком подтвердилось в опытах с инъекцией родаминдекстрана, красителя с относительно небольшими молекулами (м. в. 17 Da), который свободно проходит из желтка в бластомеры (Kimmel, Law, 1985). Вместе с тем оказалось, что более крупные молекулы Техасского красного декстрана (2000 KDa) не способны свободно диффундировать между бластомерами, что указывает на ограниченный диаметр цитоплазматических мостиков, связывающих бластомеры и желток.

Позднее начинаются деления, плоскость которых проходит в широтном направлении. Благодаря этому образуются клетки внешнего слоя (*кроющий слой*) и внутренние клетки. Последние сохраняют связь с желтком.

Дробление завершается образованием дискобластулы (рис. 12.3-5). Край бластодиска приподнимается над желтком, образуя так называемый *краевой валик*. На этой стадии бластула имеет многослойную стенку, под сводом которой располагается бластоцель. Дно полости выстлано синцитиальным перибластом, связанным с желтком (рис. 12.3-6). Как показали опыты по маркировке клеток Данио витальными красителями (Kimmel, Warga, 1987), на стадиях дробления клетки не специфицированы: потомки одной и той же клетки, маркированной в этот период, попадают в разные ткани и в разные области тела. На стадии бластулы специфицируются только самые наружные клетки кроющего слоя, которые впоследствии дают внешний покров зародыша --- перидерму. После эпителизации клеток кроющего слоя бластомерная бластула становится эпителиальной.



На ранних этапах дробления деления синхронные. Например, у Данио синхронными являются шесть первых делений. Позднее, когда на стадии бластулы происходит нормализация ядерно-цитоплазматического отношения, длительность клеточного цикла увеличивается и синхронность клеточных делений утрачивается. Изменения длительности и структуры клеточного цикла коррелируют с началом зиготической транскрипции. Этот переломный момент в развитии называют точкой перехода на стадии средней бластулы (midblastula transition point).

Важной особенностью стадии средней бластулы является то, что клетки зародыша приобретают способность к автономным движениям, а это создает предпосылки для начала морфогенетических процессов. Одним из первых событий, связанных с движением клеток, является обрастание желтка, в ходе которого бластодерма распространяется в направлении к вегетативному полюсу. Направленный рост бластодермы происходит по наружной поверхности желточного синцития с его развитой системой микротрубочек (рис 12.3-7). Деполимеризация микротрубочек или их повреждение ультрафиолетом блокируют распространение бластодермы по желтку, обнаруживая тем самым важность микротрубочек в этом процессе.

Процесс обрастания желтка часто называют эпиболией, подчеркивая его функциональную близость одному из элементов гастрюляции. Следует подчеркнуть, однако, что у костистых рыб «эпиболия» начинается до наступления собственно гастрюляции, которую обычно связывают с формированием бластопора и первичной кишки. Эта особенность развития костистых рыб находится в прямой связи с меробластическим типом дробления и необходимостью утилизировать запасы желтка, сосредоточенные в недробящейся части зародыша.

Начало гастрюляции определяется образованием по периферии бластодиска зародышевого кольца или *краевого валика* (рис. 12.3-8). Лежащая под слоем кроющих клеток масса внутренних клеток подразделяется на два зачатка - эпибласт, который лежит непосредственно под кроющим эпителием, и гипобласт, находящийся в контакте с желточным синцитиальным слоем.

Обособление эпибласта и гипобласта происходит различными способами. У *Fundulus* гипобласт возникает путем ингрессии. У Данио и многих других костистых рыб описана инволюция края бластодиска. У форели расслоение происходит вследствие центробежного движения части клеток внутренней массы.

Прослеживая судьбу маркированных клеток из разных областей ранней гастрюлы, Киммель с сотрудниками (Kimmel et al., 1995) построили карту презумптивных зачатков Данио (рис. 12.3-9). На анимальном полюсе располагаются клетки эктодермальной природы, потомки которых дают на вентральной стороне эпидермис, а на дорсальной стороне --- органы чувств, головной и спинной мозг. В экваториальной области расположены клетки энтодермальной природы, дающие глотку, печень и кишку. В промежуточной зоне находится мезодермальный зачаток, содержащий материал будущей хорды, сердца, сомитов и клеток крови. Судя по этой карте, на стадии ранней гастрюлы уже в определенной степени предопределены дорсо-вентральная и переднезадняя оси.

Следующий этап гастрюляции связан с образованием *зародышевого щита*, который возникает в результате *конвергенции* клеток внутренней массы. Клетки и эпибласта, и гипобласта начинают концентрироваться в зоне одного из меридианов экваториальной области. В результате широтного перемещения клеток, причины которого пока не раскрыты, в экваториальной области образуется утолщение --- зародышевый щит. Зародышевый щит или *краевой узелок* является гомологом спинной губы бластопора амфибий. При эктопической трансплантации он обнаруживает свойства организатора, т.е. способен вызывать развитие вторичного зародыша.

В области зародышевого щита происходит медиолатеральная интеркаляция клеток, в результате которой область щита суживается, а сам этот зачаток вытягивается в длину. Конвергенция и растяжение материала, из которого формируется зародыш, четко прослеживаются при изучении характера экспрессии некоторых генов (рис. 12.3-10). Так, экспрессия гена *no tail (ntl)* первоначально наблюдается в области зародышевого кольца. Затем паттерн

экспрессии меняет свой характер --- зона экспрессии заметно суживается и сильно растягивается в длину по одному из меридианов в анимальной области зародыша, где происходит закладка осевой мезодермы. Экспрессия гена *snail* (*snal*) имеет иной рисунок. В период конвергенции этот ген экспрессируется в клетках зародышевого кольца но прекращается после попадания клеток в область зародышевого щита. В фазе растяжения зародыша клетки, экспрессирующие *snal*, располагаются в виде двух полос параксиальной мезодермы, по обе стороны от осевой мезодермы.

В ходе гаструляции в области зародышевого щита в первую очередь происходит инволюция материала головной энтодермы. Вслед за ним уходит материал хорды и продолжается перемещение энтодермальных клеток из боковых частей. Через боковые же участки происходит перемещение клеток будущей мезенхимы. Существенным отличием гаструляции костистых рыб от гаструляции амфибий является то, что у рыб не образуются ни боковые, ни вентральная губа бластопора. Инволюирующий в области краевого узелка пласт распространяется в переднем направлении, плотно вклиниваясь между наружным пластом и перибластом. Клетки, которые инволюируют позднее, занимают и периферию задней части бластодиска, образуя здесь мезодермальный зачаток.

Наряду с конвергенцией и растяжением, которые ведут к образованию осевых структур зародыша, в ходе гаструляции продолжается процесс эпиболии. Обрастание желтка происходит неравномерно. Быстрее всего оно идет в передней и латеральных областях бластодиска. В задней области, где продолжается инволюция клеток, эпиболия несколько замедлена. В результате обрастания поверхность перибласта оказывается покрытой внезародышевой эктодермой и мезенхимой, дающей начало желточной кровеносной системе. Таким образом возникает особый зародышевый орган - желточный мешок, обеспечивающего переработку и транспортировку созданного в период оогенеза запаса питательных веществ. Возникновение желточного мешка происходило в эволюции неоднократно и независимо у животных с такой организацией яйцеклетки, которая основана на сегрегации желтка и других питательных веществ в особой зоне, которая не подвергается дроблению.

Благодаря неравномерности эпиболии передний край диска, огибая желток, приближается к заднему концу зародыша, где некоторое время остается незакрытым небольшое округлое пространство, так называемая желточная пробка. Вскоре желточная пробка замыкается, и передний край бластодиска соединяется с задним концом зародыша.

После завершения эпиболии растяжение зародыша в переднем направлении заканчивается. Тем не менее рост зародыша продолжается в заднем направлении, благодаря чему возникает хвостовая почка --- обособленный от желтка задний отдел зародыша.

Становление характерного для позвоночных плана строения тела продолжается и после гастрюляции. Основными событиями постгастрюляционного периода являются обособление и дифференциация хорды и нервной системы, а также сегментация тела. Процесс дифференциации тела зародыша происходит в переднезаднем направлении.

Сегментация затрагивает прежде всего параксиальные мезодермальные полосы, лежащие по обе стороны от хорды. Возникающие борозды последовательно, в переднезаднем направлении, отделяют обособленные скопления мезодермальных клеток - *сомиты*. Число сомитов заметно варьирует у разных видов рыб. У Данио оно достигает 30-34, у лосося - 63-64. В составе сомита у рыб имеется по крайней мере две субпопуляции клеток, образующие *миотом* --- мышечный зачаток и *склеротом* --- зачаток скелетных структур. Возможно, в составе сомита рыб имеется и типичный для более высокоорганизованных позвоночных третий зачаток --- *дерматом*, производные которого дают клетки дермы.

Дифференциация сомитов связана со сложными транслокациями клеток, значение которых пока остается невыясненным. Клетки, дающие мышечные элементы, в мезодермальной полоске локализованы в непосредственной близости от хорды и экспрессируют ген *snail* (рис.12.3-NB). После обособления сомита эти клетки мигрируют в латеральном направлении и дифференцируются

как поверхностные мышцы («медленные» мышцы), тогда как оставшиеся в глубине сомита дают «быстрые» мышцы. Клетки склеротома исходно располагаются в вентральной области сомита, но затем мигрируют в дорсальном направлении, достигают уровня хорды, где впоследствии участвуют в образовании позвонков (рис.12.3 NB-19-15B).

В конце гаструляции нейроэктодерма принимает вид нервной пластинки, образованной столбчатыми клетками (рис.12.3 NB-19-16). На стадии нейрулы симметрично расположенные левая и правая полосы пластинки сближаются и образуют плотное скопление нейральных клеток --- *нейральный киль*. При этом клетки, расположенные на латеральной границе пластинки, занимают дорсальное положение, а клетки центральной области пластинки оказываются в вентральном положении. Позднее нейральный киль округляется и приобретает вид цилиндрического стержня, проходящего по медиальной линии вдоль тела зародыша. Наконец, путем расхождения клеток или кавитации (от лат. *cavitas* --- полость) образуется полая нервная трубка.

На переднем конце нервная трубка несколько расширена. У Данио на стадии 18 сомитов передний отдел нервной трубки, который образует головной мозг, подразделяется небольшими перетяжками на 10 участков, *нейромеров* (рис.12.3 NB.19-17). Два передних нейромера представляют собой зачатки переднего мозга, соответственно, конечного мозга (*telencephalon*) и промежуточного мозга (*diencephalon*), третий нейромер --- зачаток среднего мозга (*mesencephalon*) наконец, семь задних нейромеров относятся к заднему мозгу (*rhombencephalon*) и называются ромбомерами.

### ГЛАВА 13. DEUTEROSTOMIA. ВЫСШИЕ ПОЗВОНОЧНЫЕ (AMNIOTA)

Высшие позвоночные животные --- Рептилии, Птицы и Млекопитающие --- при всех их различиях естественным образом объединяются в надкласс Amniota, единство которого определяется некоторыми важными особенностями эмбрионального развития. Благодаря этим особенностям Amniota стали настоящими наземными позвоночными, т.е. животными, развитие которых происходит непосредственно на суше и не зависит от наличия водной среды.

Для всех представителей Amniota характерно наличие целой системы зародышевых оболочек, а именно, *амниона*, *серозы (хориона)* и *аллантоиса*. Эти провизорные органы создают зародышу автономную «водную» среду (амнион), служат органами дыхания (хорио-аллантоис) и место накопления продуктов обмена (аллантоис).

Относительная независимость развивающегося зародыша от окружающей среды у Amniota (рис. 13-1) достигается благодаря радикальным изменениям оогенеза. У Рептилий и Птиц, объединяемых в группу Sauropsida, яйца чрезвычайно богаты желтком и имеют весьма крупные размеры. Благодаря огромным запасам трофических веществ зародыш Sauropsida способен достичь высокого уровня организации, будучи укрытым от влияний внешней среды (и, прежде всего, от высыхания) сложным комплексом яйцевых оболочек. Наличие такого комплекса оболочек, которые формируются уже после овуляции и оплодотворения, создало предпосылки для возникновения новой в ряду позвоночных репродуктивной стратегии, связанной с откладкой яиц на суше.

Ветвь, ведущая через Synapsida к современным млекопитающим, обособляется значительно раньше, чем образуются Archosauria (рис.13-1), свидетельствуя, что птицы и млекопитающие не являются сестринскими группами.

Эволюция млекопитающих пошла в направлении развития живорождения, которое стало возможным благодаря замене систем изоляции зародыша от среды органами, которые, наоборот, обеспечивали тесное взаимодействие зародыша со средой в половых путях материнского организма.

### **13.1. Sauropsida: рептилии и птицы**

Исследований по развитию рептилий сравнительно немного, но, тем не менее, они свидетельствуют о принципиальном сходстве эмбриогенеза рептилий и птиц. Напротив, развитие птиц исследовано весьма детально, хотя и в этом случае обращает на себя внимание очень ограниченный круг объектов: подавляющее большинство работ выполнено на курином зародыше. Среди исследователей эмбрионального развития цыпленка были такие выдающиеся естествоиспытатели как Аристотель, Гарвей, Мальпиги, Вольф, Бэр. Подробное современное описание последовательных стадий развития куриного эмбриона после откладки яиц дано Гамбургером и Гамильтоном (Hamburger, Hamilton, 1951), а до откладки яйца --- Эйял-Гилади и Кохав (Eyal-Giladi, Kochav, 1976).

**Строение яйца.** Яйцеклетка Sauropsida непосредственно после овуляции имеет вид крупного желточного шара, на поверхности которого расположена в виде небольшого диска цитоплазма с ядром. У курицы этот диск имеет в диаметре 3 - 4 мм. В верхних отделах яйцевода ооцит окружается несколькими слоями белковых оболочек. Эти оболочки служат источником влаги, а на заключительном этапе развития используются как пищевой ресурс. В более дистальных отделах яйцевода формируются пленчатые подскорлуповые оболочки. Процесс формирования оболочки завершается в конечном отделе яйцевода, где образуется внешняя известковая скорлуповая оболочка. Скорлупа, будучи механической защитой зародыша, вместе с тем служит для него источником кальция.

Строение снесенного яйца курицы представлено на рис.13-2. Видно, что яйцо окружено известковой скорлупой, под которой располагается пленчатая подскорлуповая оболочка, ограничивающая пространство заполненное белковой оболочкой. Подскорлуповая оболочка у тупого конца яйца расслаивается, образуя воздушную камеру. По своему происхождению все эти оболочки являются третичными, т.е. они образуются за счет активности клеток яйцевода. На поверхности самой яйцеклетки находится желточная оболочка, которая имеет сложный состав. Ее основу образует первичная желточная оболочка, которая вырабатывается самой яйцеклеткой, и вторичная оболочка --- *zona radiata*, которая образуется при участии фолликулярных клеток. Позднее, при попадании яйца в выводящие половые пути, образуется третий компонент желточной оболочки, представленный белковыми нитями, которые прочно связываются с основой. Свободные концы этих нитей отходят в экваториальной области яйцеклетки в виде двух диаметрально расположенных массивных белковых тяжей. По мере прохождения яйца по яйцеводу белковые тяжи спирально закручиваются и образуют халазы. Эти своего рода эластичные опорные элементы удерживают яйцеклетку в одном и том же положении относительно длинной оси яйца.

После овуляции и попадания в воронку яйцевода яйцеклетка, не имеющая еще третичных оболочек, оплодотворяется проникающими в эту область спермиями. Через поры желточной оболочки в яйцо попадает несколько сперматозоидов, из которых только один превращается в мужской пронуклеус. Оплодотворение инициирует завершение мейотического деления. Спустя примерно 5 часов после оплодотворения, когда яйцо попадает в дистальную часть яйцевода, где расположена известковая железа, начинается дробление.



**Дробление.** Дробление меробластическое. Оно затрагивает лишь цитоплазматический диск, т.е. носит дискоидальный характер (рис.13-3). Первые две борозды проходят перпендикулярно друг другу. На этой стадии бластомеры разделены только в центральной области диска, тогда как на периферии они сохраняют между собой связь. Две третьих борозды проходят параллельно первой, образуя стадию восьми бластомеров. Начиная с четвертого деления дробления образуются обособленные центральные бластомеры и соединенные между собой маргинальные периферические. Возникающие в это время горизонтальные борозды, которые проходят в плоскости, параллельной поверхности яйца, отделяют центральные бластомеры от желтка. В результате этого в центральной области бластодермы формируется подзародышевая полость (рис.13-4). К моменту снесения яйца курицы осуществляется приблизительно 14 делений зиготы, так что бластодерма свежееотложенного яйца насчитывает около 60 тысяч клеток

**Детерминация переднезадней оси.** В период нахождения яйца в матке, которое продолжается около 20 часов, благодаря перистальтическим сокращениям мускулатуры матки яйцо вращается вокруг своей длинной оси со скоростью 10 --- 15 оборотов в час. При этих условиях бластодерма также несколько смещается в направлении вращения так, что зародышевый диск располагается косо, под некоторым углом к горизонтальной плоскости. Наличие халаз удерживает яйцеклетку в таком наклонном положении, так что скорлупа и белковая оболочка вращаются вокруг стационарно расположенного желтка. Оказалось, что это имеет большое значение для детерминации будущего заднего конца и оси билатеральной симметрии зародыша. Оказалось, что задний конец зародыша как раз и формируется в этой приподнятой области бластодиска. Зависимость детерминации заднего конца зародыша птиц от силы гравитации была доказана экспериментально в опытах на неснесенных яйцах, взятых из матки до детерминации переднезадней оси зародыша (Kochav, Eyal-Giladi, 1971).

**Первичный гипобласт.** Дробление завершается образованием бластодиска, который состоит из нескольких слоев клеток (рис. 13-4). Бластодиск отделен от желтка суббластодермальной полостью, которая заполнена жидкостью, секретлируемой клетками бластодермы. Центральная область бластодиска истончается за счет выселения клеток в полость, где они, по-видимому, погибают. Периферические клетки диска, лежащие на желтке, в этом процессе не участвуют. В результате, в центральной части бластодиска образуется светлая зона или *area pellucida* (от лат. *pellucidus* --- прозрачный), представленная одним слоем клеток. На периферии бластодиска расположена кольцеобразная темная полость, *area opaca* (от лат. *opacus* --- тусклый, темный), состоящая из нескольких слоев клеток, которые лежат непосредственно на желтке (рис. 13-5, 13-6). На стадии своего формирования бластодиск морфологически имеет радиальную симметрию *area pellucida* и *area opaca*. Тем не менее, экспериментально показано, что на этой стадии уже детерминирована переднезадняя ось зародыша.

Будущая задняя область зародыша отличается более высоким уровнем метаболизма и интенсивностью клеточной пролиферации. В этой области происходит формирование *первичного гипобласта* --- внутренней клеточной массы, которая выполняет исключительно важную роль в формировании зародышевой полоски. В задней области *area pellucida* расположен серповидный клеточный гребень, так называемый *серп Раубера - Коллера* (рис. 13-5, А). Из области серпа происходит выселение клеток, которые активно перемещаются с помощью амебоидных движений. Образовавшийся задний клеточный фронт распространяется под эпибластом в переднем направлении, соединяясь по мере продвижения с отдельными клетками, которые выселяются самостоятельно по всей поверхности бластодермы (рис.13-5, Б). В результате описанной *ингрессии* клеток и их направленному движению в центральной области бластодиска формируется внутренний лежащий под эпибластом слой -- - первичный гипобласт (рис. 13-5, В).

Клетки гипобласта связаны между собой плотными контактами, но лежат изолировано от клеток *area opaca*. Оказалось, что клетки эпибласта и гипобласта имеют разные антигенные свойства, и при смешивании дезагрегированные клетки этих зачатков обнаруживают способность к сортировке.

Первичный гипобласт играет роль индуктора, под действием которого в бластодиске возникает продольно ориентированный зародыш --- *первичная полоска* (рис.13-6). Появление первичного гипобласта определяет положение трех осей будущего тела животного: переднезадней или ростокаудальной, дорсовентральной, и, наконец, медиальной.

**Гастроляция.** Начало гастроляции характеризуется возникновением двигательной активности клеток эпибласта. Направление движения клеток в левой и правой половинах зародыша зеркально симметричны. В левой половине зародыша клетки эпибласта обнаруживают круговое движение, направленное против часовой стрелки в сторону каудальной области. В правой половине аналогичное движение происходит по часовой стрелке. В результате этого движения, которое иногда называют «движением полонеза», на заднем конце эпибласта образуется скопление клеток --- зачаток *первичной зародышевой полоски*.

Зародышевая полоска на этой стадии имеет вид небольшого клина, своим острием направленным вперед (рис.13-7, А). Впоследствии этот зачаток растет в виде тяжа по срединной линии вперед и превращается в зародышевую полосу (рис.13-7, Б, В, Г - 4). Первичная зародышевая полоска птиц представляет собой область зародыша, в которой клетки эпибласта превращаются в зародышевые листки --- эктодерму, мезодерму и энтодерму. Энтодерма и мезодерма образуются за счет миграции клеток эпибласта из состава полосы. Этот процесс выселения клеток из пласта *называют ингрессией*. В ростральной половине зародышевого диска входящие в состав эпибласта перспективные энтодермальные клетки движутся в направлении полосы и путем ингрессии вселяются в состав гипобласта, оттесняя клетки последнего в ростральном направлении к границе между *area pellucida* и *area opaca* (рис.13-7, Б, В). Клетки гипобласта в этой области образуют *первичные половые клетки* (рис.13-7, Г), а также дают часть внезародышевой мезодермы.

В каудальной половине зародышевого диска в направлении полосы движутся клетки, потомки которых образуют мезодерму. Сначала образуется мезодерма, входящая в состав внезародышевых провизорных органов. Позднее сходным образом образуется и мезодерма зародыша (рис. 13-8). После ингрессии через первичную зародышевую полосу клетки мезодермы располагаются между эпибластом и формирующейся энтодермой, при этом зародыш становится трехслойным. Через ростральный конец полосы, который называется Гензеновским узелком, в переднем направлении поступает материал мезенхимы головы, будущей хорды. В средней части зародышевой полосы в латеральном направлении выселяется мезодерма, образующая впоследствии сомиты и латеральную мезодермальную полосу (рис. 13-9).

Важным элементом формообразования на стадии гастрюляции служит *регрессия зародышевой полоски*: за счет смещения Гензеновского узелка в каудальном направлении полоска укорачивается. Поскольку одновременно с этим движением ингрессия хордомезодермы продолжается, материал зачатка хорды занимает медиальное положение вдоль всего тела формирующегося зародыша (рис. 13-10). Благодаря ингрессии клеток мезодермы и энтодермы в эпибласте остаются лишь эктодермальные элементы, дающие начало нервной системе и покровам зародыша. В ходе регрессии зародышевая полоска образует хвостовую почку, материал которой является источником как нервных, так и мезодермальных элементов хвоста.

Таким образом, можно констатировать, что плоскостная организация зародыша птиц и значительные линейные параметры бластодиска коррелируют с видоизменением механизмов гастрюляции, обеспечивающих направленное перемещение клеточных масс. Вместо субэктодермального движения мезодермального материала, характерного для гастрюляции *Anamnia*, у птиц перемещение презумптивной мезодермы и энтодермы происходит в составе поверхностно расположенного эпибласта. Ингрессия этих клеток и формирование из них разнообразных зачатков (проспективная энтодерма, проспективная мезодерма головы, хордомезодерма, проспективная мезодерма сердца, проспективная мезодерма сомитов и т.д.) происходит по мере того, как эти клетки достигают соответствующих позиций вдоль зародышевой полоски. Процесс ингрессии не беспорядочен: он сосредоточен в области медиальной оси зародыша, что морфологически проявляется в образовании первичной бороздки в области полоски и ямки в области Гензеновского узелка.

Это эволюционное достижение, которое присуще птицам, и которое, судя по сведениям о раннем развитии крокодилов, характерно и для некоторых современных рептилий, ведущих, как и птицы, свое начало от псевдозухий, возникло в глубокой древности. Можно предположить, что описанное видоизменение гастрюляции возникло после отхождения ветви, ведущей к Черепахам.

У черепах процесс гастрюляции сохраняет черты сходства с гастрюляцией *Anamnia* (рис. 13-11). В ходе дробления у черепах также образуется бластодиск, подразделенный на светлое и темное поля. Поверхностные клетки бластодиска в области *area pellucida* имеют вид однослойного столбчатого эпителия и образуют *зародышевый щит*. Клетки, лежащие в глубине диска, образуют энтодерму, отграничивающую полость бластулы от желтка. В периферической зоне зародышевого щита в той области, которая затем становится задним концом зародыша, образуется округлое скопление клеток или *первичная пластинка*. В центре первичной пластинки возникает гастральное впячивание и образуется бластопор. Через верхнюю (переднюю) губу бластопора происходит инволюция клеток зародышевого щита, лежащих впереди от первичной пластинки. Через боковые губы инволюирует материал, лежащий латерально относительно бластопора. Дно архентерона образуется за счет клеток, поступающих сюда из задней области первичной пластинки. Проходящие через верхнюю губу бластопора клетки после подворачивания под эктодерму движутся в переднем направлении и дают хордомезодерму. Презумптивная мезодерма, образующая нижнюю часть архентерона и находящаяся в контакте с энтодермой, начинает смещаться в верхнем направлении. При этом мезодермальный материал в виде однослойной пластинки распространяется под зародышевым щитом между эктодермой и энтодермой. Вследствие этого перемещения клеток нижняя стенка архентерона разрыхляется, а затем и полностью исчезает, в результате чего бластопор через возникший нейрокишечный канал получает связь с полостью желточного мешка.

Отмеченные различия процессов гастрюляции у птиц и черепах иногда объясняют (П. П. Иванов, 1937) тем, что эволюция онтогенеза птиц была связана, в частности, с преобразованием первичной пластинки предковых форм в первичную полосу. Это видоизменение привело к утрате открытого бластопора и к его превращению в щелевидную вытянутую вдоль всей полосы область ингрессии клеток эпибласта. К сожалению, эмбриология раннего развития рептилий изучена совершенно недостаточно для построения эволюционных гипотез.

**Туловищные складки.** Особенностью эмбриогенеза Amniota является образование *туловищных складок*, в состав которых входят производные всех трех зародышевых листков, и которые отделяют зародыш от внезародышевых структур. Появление в эмбриогенезе туловищных складок --- головной, двух боковых (латеральных) и хвостовой (каудальной) --- служит прологом формирования трехмерной организации зародыша, до этого распластанного на поверхности желтка в виде диска.

*Головная складка* возникает непосредственно впереди зачатка головного мозга в виде полумесяца, выпуклая сторона которого обращена в переднем направлении (рис. 13- 12). Головная складка распространяется в каудальном направлении, обособляя формирующуюся голову от бластодиска. Следствием углубления головной складки в заднем направлении является возникновение *субцефалического (подголовного) кармана*, выстланного эктодермой, и передней кишки, короткой энтодермальной трубки (рис.13-13).

Распространяясь назад, головная складка соединяется с *боковыми туловищными складками*, которые растут в медиальном направлении, формируя кишечную трубку и приподнимая тело зародыша над желтком.

Несколько позднее закладывается *хвостовая туловищная складка*. Эта складка врезается в переднем направлении, образуя субкаудальный (подхвостовой) карман и заднюю кишку. Туловищные складки, двигаясь в направлении центра бластодиска, соединяются и образуют стебелек, который соединяет среднюю кишку с желточным мешком (см. ниже). С помощью стебелька зародыш связан с расположенными вне зародыша оболочками.

**Зародышевые оболочки.** Как уже отмечалось, зародыши Amniota имеют сложную систему оболочек, провизорных органов (от лат. *provisorius* --- предварительный, временный), обеспечивающих развитие зародыша (рис. 13- 14). Среди этих органов различают желточный мешок, амнион и аллантоис.

*Желточный мешок* (рис. 13-15) образуется в результате разрастания внезародышевой спланхноплевры по поверхности желтка. Энтодерма желточного мешка переходит непосредственно в энтодерму средней кишки зародыша. Область соединения средней кишки с желточным мешком в ходе развития сужается и превращается в *желточный проток*. В мезодермальном листке желточного мешка (внезародышевая висцеральная мезодерма) формируется обширная сосудистая сеть. Растворимые продукты, которые образуются при переваривании желтка энтодермой, через желточные вены поступают в зародыш.

*Амнион* и *хорион* закладываются одновременно в виде *единой амниотической складки* внезародышевой соматоплевры (рис. 13-14, рис.13-15). Сначала эта складка появляется впереди головы (*головная складка*), затем она распространяется в каудальном направлении. В области туловища образуются боковые складки, которые растут дорсомедиально и срастаются по средней линии. Наконец, образуется и *хвостовая амниотическая складка*, рост которой направлен вперед. В области соединения растущих навстречу друг другу складок сначала образуется амниотический шов (рис. 13-14, Б). Затем эктодермальные и мезодермальные листки встретившихся складок сливаются, в результате чего возникают две оболочки. Наружная оболочка или *хорион* состоит из внезародышевой эктодермы, обращенной к подскорлуповой оболочке, и мезодермы. Внутренняя оболочка или *амнион* состоит из наружной мезодермы и обращенной к зародышу эктодермы. Эктодерма и мезодерма амниона непосредственно являются непосредственным продолжением соответствующих листков зародыша. Эктодермальный эпителий амниона дифференцируется и секретировать амниотическую жидкость, *заполняющую амниотическую полость*, пространство между зародышем и амниотической оболочкой (рис.13 - 16). Полость между хорионом и амнионом представляет собой *экзоцелом*, выстланный внезародышевой соматической мезодермой. В мезодермальном листке амниона формируются кровеносные сосуды и гладкие мышечные элементы, обеспечивающие ритмические сокращения амниона.



*Аллантоис.* Аллантаис представляет собой вырост клоакального отдела задней кишки (13-17). Внутренняя полость этого органа формируется за счет энтодермального эпителия. Снаружи аллантаис покрыт висцеральной мезодермой. Разрастаясь, аллантаис попадает в экзоцелом. Внешняя стенка аллантаиса, покрытая висцеральной мезодермой, срастается с соматической мезодермой хориона. В результате этого срастания возникает новый орган --- *хориоаллантаис*. Эктодерма хориона сильно уплощается, и многочисленные капилляры, формирующиеся в мезодермальном листке хориоаллантаиса, оказываются в непосредственной близости от подскорлуповой оболочки. Такая топография обеспечивает высокий уровень газообмена, т.е. выведения углекислого газа и поглощения кислорода. Кровеносная сеть хориоаллантаиса связана с кровеносной системой зародыша пупочными венами и артериями (рис.13-18).. Кроме функции дыхания хориоаллантаис обеспечивает извлечение и транспорт кальция из известковой оболочки, который используется зародышем, в частности, при формировании костного скелета. Важная функция аллантаиса состоит и в том, что, будучи выростом клоакального отдела пищеварительной системы, куда открываются и выводные протоки почек, аллантаис служит органом накопления продуктов обмена, которые выводятся из зародыша в течение эмбрионального периода развития.

### **13.2. Млекопитающие**

Класс млекопитающих представляет собой высшую ступень эволюции животных. В процессе эволюции млекопитающих в отряде приматов возникло семейство *Hominidae*, представленное одним видом, который носит название современный человек разумный (*Homo sapiens*). Мыслительная способность человека разумного вывела Природу на принципиально новую ступень развития, на ступень самопознания.

Млекопитающие насчитывают, по оценкам специалистов, до 4500 видов, которые заселяют все страны света. Млекопитающие характеризуются огромным разнообразием форм. Наряду с наземными животными имеются настоящие водные звери --- ластоногие, которые только размножаются вне водной среды, а также китообразные и сиреновые, у которых и размножение происходит в воде. Хорошо известны рукокрылые, освоившие воздушную среду.

Класс млекопитающих подразделяется на два подкласса. Подкласс Первозвери (Prototheria) (от греч. πρωτος --- первый, θηριον --- дикий зверь), в составе которого имеется лишь один отряд --- Однопроходные (Monotremata), и подкласс Настоящие звери (Theria), насчитывающий 19 отрядов. Подкласс Theria состоит из двух инфраклассов: Низшие звери (Metatheria) и Высшие звери (Eutheria). Metatheria представлены одним отрядом --- Сумчатых (Marsupialia) (от лат. marsupium --- небольшая кошелка).

Внешними отличительными особенностями Млекопитающих служат волосяной покров и наличие молочных (грудных) желез. Волосяной покров способствует поддержанию гомеотермии. Молочные железы --- важнейшее завоевание эволюции животных --- представляют собой видоизмененные потовые железы. С помощью этих желез обеспечивается вскармливание детенышей. Именно от латинского названия грудной железы (mamma) происходит и наименование всего класса --- Mammalia.

Из многочисленных анатомических особенностей млекопитающих отметим лишь наличие двух желудочков в сердце, альвеолярные легкие и гипертрофированный мозг.

Названные выше крупные таксономические группы млекопитающих различаются стратегией размножения.

*Однопроходные*, объединяющие ехидн и утконосов, являются яйцекладущими млекопитающими. Оплодотворенное яйцо поступает по яйцеводу в клоаку, а затем откладывается самкой. Яйцо снабжено прочной скорлупой. У ехидн самки вынашивают яйца в особой сумке. Утконосы высиживают яйца в гнезде как птицы.

У *сумчатых млекопитающих* из отряда Marsupialia имеет место кратковременная беременность, в течение которой зародыш развивается в матке. У сумчатой мыши, например, беременность продолжается всего 9 дней. После рождения развитие зародышей продолжается в сумке, в которой расположены соски грудных желез (рис. 13-19).

У *высших или плацентарных млекопитающих* зародыш вскоре после дробления имплантируется в ткани матки так, что между тканями плода и матери устанавливается непосредственная связь. У этих животных образуется настоящая плацента, которая через кровеносную систему обеспечивает плод необходимым питанием и осуществляет газообмен. Продолжительность беременности у высших млекопитающих существенно больше, чем у сумчатых. У слонов она длится почти два года.

**Дробление.** Яйца у однопроходных, также как у рептилий и птиц, телолецитальные. Они имеют сравнительно крупные размеры и богаты желтком. Дробление меробластическое. В результате дробления, также как у *Sauropsida*, формируется бластодиск. Периферические клетки бластодиска отличаются амебоидной подвижностью и становятся вителлофагами. Они образуют окаймляющее диск зародышевое кольцо. Клетки зародышевого кольца и диска распространяются по поверхности желтка центробежно. В результате этого образуется однослойная бластодерма, и зародыш приобретает сферическую форму. Зародыш на этой стадии называют бластоцистой. За счет потребления желтка и веществ, выделяемых маткой, бластоциста быстро растет. Из бластодермы в подзародышевую полость выселяются клетки, которые оседают на поверхности желтка и, размножаясь, образуют внутренний эпителиальный пласт, после чего зародыш становится двухслойным. Внешний слой клеток называют эпибластом, тогда как внутренний, лежащий на желтке, гипобластом.

У Сумчатых яйца мелкие с ограниченным содержанием желтка. Диаметр яйца опоссума составляет 130 мкм, сумчатой куницы --- около 200 мкм. В начале дробления происходит *дейтоплазмолиз*, т.е. выталкивание желтка из бластомеров под яйцевую оболочку (рис.13-20). Дробление имеет голобластический характер. Важную роль в формировании зародыша играет гликопротеиновая оболочка яйца --- *zona pellucida*. Внутренняя поверхность *zona pellucida* обладает сильными адгезивными свойствами. Клетки дробящегося зародыша распластываются на этой поверхности и образуют эпителиальный слой, окружающий бластоцель, в котором находится вытолкнутый из яйца желток. Образуется однослойная бластоциста.

Особенностью эмбрионального развития сумчатых, которая по-видимому, характерна для всего подкласса Настоящих зверей (Theria), является ранняя спецификация клеток бластоцисты. В бластоцисте различают *эмбриобласт*, из которого образуется собственно зародыш, и *трофобласт*, который обеспечивает имплантацию зародыша и его взаимодействие с тканями матки. Механизмы этой спецификации еще не раскрыты, хотя у некоторых сумчатых отмечается определенная топографическая связь между местом образования эмбриобласта и локализацией желтка.

У высших млекопитающих яйца имеют небольшие размеры, варьируя обычно в пределах 70 --- 120~ мкм. Так, у крысы диаметр яйца составляет 70~ мкм, у мыши --- 75~ мкм, у кролика и человека – 120~ мкм. По количеству желтка их можно отнести к алецитальному или олиголецитальному типу. Дробление голобластическое, асинхронное. Дробление происходит во время перемещения яйца по яйцеводу (рис. 13-21). Отличительной чертой дробления млекопитающих является то, что клеточные циклы в этот период имеют значительную продолжительность (12 часов и более), что, возможно, связано с ранней спецификацией клеток. Тип дробления --- ротационный. Положение плоскостей дробления в каждом бластомере устанавливается автономно (рис.13-22). Бластомеры обладают ярко выраженными адгезивными свойствами, благодаря чему, видимо, и происходит изменение их взаиморасположения.

У многих высших млекопитающих, в том числе у лошади, летучей мыши, крысы также обнаружен дейтоплазмолиз, т.е. выведение желточных зерен из бластомеров под яйцевую оболочку (Г.А. Шмидт, 19NB). Этот желток утилизируется зародышем, по-видимому, благодаря тому, что клетки образующегося позже трофобласта вырабатывают протеазы, которые способствуют разрушению оболочки яйца перед имплантацией.

На стадии восьми бластомеров заметно изменяются адгезивные свойства клеток. Между бластомерами образуются плотные контакты. В результате происходит *компактизация* зародыша, явление, характерное, по-видимому, только для высших млекопитающих (рис. 13-23). В ходе компактизации отдельные бластомеры утрачивают свою внешнюю индивидуальность, и тесно прилегают друг к другу. Наличие плотных контактов изолирует внутреннюю область зародыша от внешней среды. На стадии 16-и клеток зародыш приобретает вид *морулы* (от лат. *mogus* --- тутовая ягода). Клетки, находящиеся внутри морулы, связаны между собой щелевыми контактами. Как и у сумчатых, клетки зародыша рано специфицируются, образуя расположенный снаружи *трофобласт* и внутреннюю область --- *эмбриобласт* (рис. 13-24). За счет трофобласта впоследствии формируется хорион зародыша, который участвует в имплантации и входит в состав детской части плаценты. Эмбриобласт или *зародышевый узелок* представляет собой полярно расположенное скопление клеток, известное в современной литературе как *внутренняя клеточная масса* (ВКМ). Клетки ВКМ при дальнейшем развитии образуют сам зародыш, а также его провизорные органы --- амнион, аллантоис, желточный мешок. На стадии 64-х клеток на долю ВКМ приходится примерно 25% клеток зародыша.

Эпителиальные клетки трофобласта осуществляют активный транспорт ионов и создают осмотический градиент, благодаря которому в морулу поступает жидкость. При этом происходит образование полости, процесс, который называется *кавитацией* (от лат. *cavitas* --- полость). Пузыревидный зародыш или *бластоциста* состоит из трех областей (рис. 13-24): 1) клетки трофобласта, отграничивающие полость бластоцисты; 2) клетки трофобласта, находящиеся на поверхности ВКМ, или Рауберов слой; 3) зародышевый узелок или внутренняя клеточная масса. Некоторые авторы называют зародышевый узелок с учетом плюрипотентности составляющих его клеток --- *плюрибластом*.

Начальная дифференциация ВКМ состоит в обособлении гипобласта, тонкого слоя клеток, который непосредственно граничит с полостью бластоцисты. Из гипобласта образуется внезародышевая энтодерма, которая впоследствии входит в состав желточного мешка. Клетки ВКМ, находящиеся в контакте с Рауберовым слоем, образуют эпибласт --- зачаток, клетки которого в ходе гастрюляции дают все три зародышевых листка.

Развитие бластоцисты у однопроходных, сумчатых и плацентарных млекопитающих представляет собой яркий пример *эквивинальности*, т.е. явления, в ходе которого одна и та же морфологически сходная структура возникает за счет активности различных механизмов. У Однопроходных в образовании сферического зародыша ведущую роль играет перемещение клеток по поверхности желтка. Возможно, что движению клеток, как и у птиц, способствует подскорлуповая оболочка. У Сумчатых распространение клеток происходит по *zona pellucida*. В отличие от этого у высших млекопитающих бластоциста образуется, прежде всего, за счет кавитации зародыша.

**Гастрюляция.** Принципиальная схема формирования зародышевых листков у млекопитающих в известной мере сходна с процессами, происходящими у птиц. У Однопроходных наблюдается ингрессия клеток бластодиска. Попадая в подзародышевое пространство, эти клетки образуют гипобласт --- сначала рыхлый, а позднее плотный слой клеток, подстилающий эпибласт. Между эпибластом и гипобластом формируется полость. В эпибласте возникает зародышевая полоска, которая служит источником образования эктодермы, мезодермы и энтодермы. Производные этих трех листков распространяются по поверхности желтка и образуют желточный мешок.

У Сумчатых способы образования гипобласта несколько варьируют. У некоторых видов образуются гигантские клетки-родоначальницы, которые мигрируют под эпибласт и путем интенсивной пролиферации формируют гипобласт. У других видов происходит ингрессия клеток, которые по своим размерам не отличаются от клеток эпибласта. Так или иначе, но первым шагом к образованию зародышевых листков у Сумчатых служит формирование двухслойного зародыша. Позднее формируется зародышевая полоска с Гензеновским узелком, клетки которой мигрируют с образованием энтодермы и мезодермы.

Наиболее подробно процесс гастрюляции исследован у высших млекопитающих (рис. 13-25). Здесь гипобласт образуется путем своеобразной деламинации, в ходе которой клетки эмбриобласта, обращенные к полости бластоцисты, отделяются от клеток наружных слоев базальной мембраной (рис.13-26). Клетки гипобласта распространяются по внутренней поверхности трофэктодермы, которая ограничивает полость бластоцисты, образуя, таким образом, энтодерму провизорного органа, который по аналогии с сумчатыми и однопроходными называют желточным мешком. Позднее, когда сформируется и мезодермальный листок этого органа, за счет которого развивается плотная сеть кровеносных сосудов, «желточный мешок», который, естественно, не содержит никакого желтка, и лишь ограничивает полость бластоцисты, превращается в орган, обеспечивающий связь зародыша с материнским организмом.

Полярная трофэктодерма, находящаяся в непосредственном контакте с ВКМ, пролиферирует и образует заметное клеточное скопление. Внешние слои этого скопления, разрастаясь в слизистой оболочке матки, дают *эктоплацентарный конус*, с помощью которого зародыш закрепляется в тканях матки (рис.13-27). Внутренние слои скопления, лежащие между эктоплацентарным конусом и эмбриобластом, являются источником внезародышевой эктодермы, которая впоследствии входит в состав хориона.



Эпибласт, т.е. те клетки ВКМ, которые остаются после выделения первичной энтодермы, как и у птиц, является зачатком, который, как было уже сказано, дает начало всем тканям собственно зародыша, а также внезародышевые мезодермальные компоненты амниона, желточного мешка, хориона и аллантаоиса.

Появлению зародышевых листков предшествует образование *яйцевого цилиндра*, который возникает в результате направленного роста эпибласта в полость бластоцисты (рис. 13-27). При этом эпибласт, который первоначально представляет собой диск столбчатых клеток, складывается в виде уплощенного мешочка. Область, оказавшаяся внутри мешочка, соответствует поверхности диска птиц. Наружная стенка мешочка покрыта первичной энтодермой и гомологична внутренним слоям бластодиска птиц. Соответственно этой топографии первичная полоска у высших млекопитающих формируется на внутренней (вогнутой) поверхности яйцевого цилиндра (рис. 13-28). Возникновение полоски, как и у других Amniota знаменует собой формирование продольной билатеральной оси зародыша (13-29). Дальнейшее развитие полоски связано с возникновением Гензеновского узелка, ингрессией материала энтодермы и мезодермы, и формированием комплекса осевых зачатков, типичных для всех позвоночных. Вселяющиеся под поверхностный слой эпибласта клетки образуют энтодерму зародыша, хорду и осевую мезодерму (рис. 13-30). Сопоставление карт презумптивных зачатков у высших млекопитающих и птиц выявляет большое сходство в топографии презумптивных зачатков.

**Зародышевые оболочки.** У млекопитающих имеются все виды зародышевых оболочек, характерных для Amniota --- желточный мешок, амнион, хорион, и аллантаоис (рис. 13-31). Все эти структуры, за исключением хориона, образуются за счет материала зародышевого узелка.

Амнион у целого ряда млекопитающих закладывается на стадии дефинитивной первичной полоски в виде складок соматоплевры, которые затем смыкаются над зародышем, образуя, как и у птиц, обращенную к зародышу амниотическую оболочку, экзоцелом и хорион. У многих млекопитающих, однако, механизм формирования амниотической оболочки утратил свои примитивные черты, и мезодермальная составляющая этого органа, которая отсутствует в начальный период, появляется существенно позже. Например, у человека, обезьян, мыши амнион закладывается в результате расхождения клеток зародышевого узелка (рис. 13-32, 8). Такой способ формирования называют схизоцельным (от греч. σχιζω --- раскалываю; κοίλοα --- углубление, полость) или кавитационным (от лат. cavitus --- полость). Клетки, ограничивающие образующуюся таким образом полость, имеют эктодермальную природу. С одной стороны, это --- эктодерма зародыша, которая находится в контакте с гипобластом, а, с другой стороны, эктодерма амниона, которая располагается под трофобластом. В некоторых случаях полость амниона поначалу ограничивается с одной стороны непосредственно трофобластом. Позднее, однако, боковые стенки эпибласта образуют направленные в сторону полости складки, которые растут и соединяются, образуя полость, ограниченную клетками эктодермы эпибласта. О гомологичных амниону и серозе птиц зародышевых оболочках этих млекопитающих можно говорить лишь после врастания мезодермы. Разные способы формирования амниона могут служить еще одним примером эквививальности.

Что касается хориона, то он имеет выраженную гомологию с хорионом птиц только у тех видов, у которых амниотическая оболочка образуется с помощью складок соматоплевры. У большинства плацентарных млекопитающих хорион формируется за счет трофэктодермы, без участия эктодермы. На ранних стадиях трофобласт не имеет ворсинок (*предворсиночный трофобласт*). Позднее образуются *первичные ворсинки*, имеющие чисто эпителиальную структуру. После врастания в ворсинки мезенхимы говорят о *вторичных ворсинках*, а после развития в них кровеносных сосудов --- о *третичных ворсинках*.

Аллантоис млекопитающих, будучи выростом спланхноплевры, полностью гомологичен соответствующему провизорному органу птиц. Он разрастается в экзоцеломе, объединяется с хорионом и обеспечивает связь кровеносной системы зародыша с сосудами хориона (рис. 13-32). По мере ослабления функции желточной плаценты аллантоис все в большей степени берет на себя функцию связующего звена с плацентой. У человека аллантоис остается рудиментарным органом, расположенным в ножке тела плода.

**Имплантация.** Важным завоеванием, которое открыло широкие возможности адаптивной эволюции млекопитающих, стало возникновение имплантации и плацентации. Живорождение у млекопитающих стало не только средством освоения новых ниш обитания, но и, прежде всего, условием, обеспечивающим относительно большую продолжительность развития плода, что, в свою очередь, послужило предпосылкой формирования животных с более сложной и совершенной системой дифференциации. В конечном счете, эти предпосылки стали одной из причин, приведших к возникновению приматов, включая и Человека разумного.

Процесс имплантации (от лат. *im/in* --- в, *plantatio* --- посадка), обеспечивает внедрение зародыша в стенку матки (рис. 13-33). Он характерен для всех представителей подкласса *Theria*, т.е. для сумчатых и высших млекопитающих. В ветви, которая привела к возникновению Высших зверей, имплантация была дополнена плацентацией или формированием особого органа --- плаценты, выполняющего функцию снабжения зародыша кислородом и питанием за счет материнского организма. Нельзя не заметить, впрочем, что плацента возникает и у некоторых сумчатых (например, сумчатый барсук *Perameles iscodon*), и даже у живородящих ящериц.

Имплантация зародышей происходит на стадии бластоцисты, которая формируется по мере продвижения зародыша по яйцеводам в матку. У человека зародыш попадает в матку на 6 --- 7 день после оплодотворения. Имплантация становится возможной после освобождения зародыша от яйцевой оболочки *zona pellucida*. Эта оболочка разрушается под действием своего рода «фермента вылупления» --- трипсиноподобной протеазы, которую вырабатывают клетки трофобласта. Под давлением увеличивающейся в объеме бластоцисты ослабленная протеазой *zona pellucida* разрывается, и зародыш приходит в непосредственный контакт с эпителием, выстилающим полость матки.

Имплантация подразделяется на две фазы: *фазу адгезии* (рис. 13-33, А) и *фазу инвазии* (рис. 13-33, Б-Г). Благодаря специфической адгезивности клеток трофобласта и, прежде всего, клеток трофобласта, граничащих с эмбриобластом, зародыш связывается с белками внеклеточного матрикса эпителиальной выстилки эндометрия матки. Это прикрепление опосредовано интегринами клеток трофобласта, которые взаимодействуют с коллагеном, фибронектином и другими белками матрикса. Инвазия зародыша в стенку матки происходит вследствие того, что клетки трофобласта секретируют протеазы, которые разрушают и матрикс, и сам эпителий матки. При этом клетки трофобласта начинают активно пролиферировать, и проникают в промежутки между клетками стромы матки. Быстрорастущий трофобласт дифференцируется на две области. Если внутренний слой, именуемый *цитотрофобластом*, сохраняет клеточное строение, то наружный слой, который непосредственно контактирует с соединительной тканью матки, характеризуется делениями без цитокинеза. В результате образуется синцитиальная структура, называемая *синтрофобластом* или *синцитиетрофобластом*. У человека инвазия зародыша в эндометрий матки происходит на 11 --- 12 день после оплодотворения. По мере развития трофобласт после образования гипобласта и мезодермы называют *трофэктодермой*, а позднее, когда трофэктодерма соединяется с соматическим листком мезодермы, эта структура именуется *хорионом*. Хорион образует ворсинки и входит в состав плаценты.

**Плацентация.** Плацента (от лат. placenta --- лепешка) представляет собой орган, который формируется тканями плода и материнского организма, и осуществляющий трофическую функцию в период беременности, обеспечивая плод питанием и кислородом.

Со стороны плода в образовании плаценты участвует хорион, который обеспечивает взаимодействие с тканями матки. Хорион срастается с желточной оболочкой или с аллантоисом, которые у высших млекопитающих выполняют функцию связующего звена между плацентой и зародышем. В зависимости от того, связана ли плацента с сосудами желточного мешка или аллантоиса, различают, соответственно, *хориовителлиновую (желточную)* и *хориоаллантоидальную* плаценту (рис. 13-32). У одного и того же вида на разных стадиях могут функционировать разные виды плаценты. Желточная плацента описана у броненосцев, летучих мышей, грызунов, насекомоядных, некоторых сумчатых и других млекопитающих. Хориоаллантоидальная плацента имеется у всех Eutheria.

Непосредственный контакт тканей плода с материнским организмом, как уже отмечалось, осуществляет хорион. Иногда эта связь ограничивается как, например, у свиней, контактом клеток хориона с эпителиальной выстилкой матки (*эпителиохориальная плацента*) (рис. 13-34, А). У жвачных эпителий матки разрушается, и клетки хориона погружаются в соединительную ткань матки. Такой тип плаценты носит название *синдесмохориальной* (рис. 13-34, Б). У хищных клетки хориона контактируют непосредственно с эндотелием кровеносных сосудов матки, что характерно для *эндотелиохориальной плаценты* (рис. 13-34, В). У приматов, насекомоядных и грызунов образуется *гемохориальная плацента* (рис. 13-34, Г). У этих животных в области контакта тканей матки с хорионом разрушается и эндотелий капилляров. При этом материнская кровь изливается в соединительно-тканые лакуны и непосредственно омывает клетки хориона. У некоторых грызунов описана *гемозндотелиальная плацента*. В этом случае происходит истончение хориального эпителия, так что его наличие обнаруживается только методами электронной микроскопии. У этих животных кровь матери максимально приближена к эндотелиальной стенке капилляров плода.

Хориоаллантоидальные плаценты различаются топографией расположения ворсинок хориона, обеспечивающих контакт с материнским организмом. Ворсинки могут располагаться в виде единого поля, образуя своего рода диск. Плаценты такого типа называют *дисковидными*. Дисковидные плаценты характерны для приматов, грызунов и некоторых других млекопитающих. *Зональная* плацента характеризуется наличием округлой полосы хориальных ворсинок (хищники, тюлени). Наконец, ворсинки могут группироваться в виде отдельных пятен --- *котиледонов* (от фр. cotyledon --- семядоля NB). *Котиледонная* или *диффузная* плацента характерна для жвачных животных (рис.13-35).

Проникновение клеток хориона в ткани эндометрия вызывает ответную реакцию. Фибробласты стромы матки в области имплантации зародыша интенсивно пролиферируют, полиплоидизируются и заметно увеличиваются в размерах, образуя эпителиоидную ткань. Эта видоизменная ткань входит в состав материнской части плаценты и во время родов вместе с зародышевыми оболочками (*послед*) отторгается от матки. Поэтому ее называют *децидуальной* тканью (от лат. decido --- падать, ниспадать). Децидуальная реакция, в результате которой возникают специализированные децидуальные клетки, играет важную роль в создании иммунологического барьера, предотвращающего взаимодействие иммуноглобулинов и иммунцитов матери с антигенами отцовской природы на поверхности зародыша. Вероятно, децидуальная оболочка способствует также защите плода от инфекций, препятствуя проникновению микроорганизмов из материнского организма. Вместе с тем децидуальная реакция не допускает неконтролируемую инвазию клеток трофобласта. Плацента, в состав которой входит децидуальная ткань, называется *отпадающей* или *децидуальной*, в отличие от *контактной* (*недецидуальной*) плаценты эпителиохориального типа.

## ГЛАВА 14. ОНТОГЕНЕЗ И ЭВОЛЮЦИЯ

Проблема эволюции животных, интенсивно разрабатываемая в последние полтора столетия, таит много нерешенных загадок, раскрытие которых зависит от знания многих биологических (морфологических, эмбриологических, молекулярно-биологических) и палеонтологических параметров.

Согласно современным представлениям, большинство главных ветвей филогенетического древа билатеральных Metazoa за исключением нескольких наземных групп возникло 545 --- 505~млн. лет назад в Кембрийский период, который продолжался около 40 --- 50~млн. лет. Находки ископаемых многоклеточных свидетельствуют о том, что все известные ныне принципиальные планы строения тела билатеральных возникли примерно в течение 20~млн. лет («Кембрийский взрыв»). Освоение суши наземными членистоногими и позвоночными происходило значительно позднее (спустя примерно 80~млн. лет). Этот процесс стал возможным, прежде всего благодаря появлению дыхательного аппарата, способного усваивать кислород воздуха, и достаточно мощного двигательного аппарата, обеспечивающего подвижность на суше и в воздушном пространстве без поддержки водной среды.

Еще раньше в докембрийские времена возникли Стрекающие. Ископаемые остатки кишечнополостных, плоских и кольчатых червей, а также членистоногих обнаружены в Вендских отложениях на берегу Белого моря, насчитывающих, по данным изотопного анализа, 650 – 690~млн. лет (NB Примечание: венды или венеды --- наименование одного из древних славянских племен). Полагают, что примитивные кишечнополостные возникли на 50~млн. лет раньше. Еще более древними животными являются губки, начало возникновения которых приходится, по-видимому, на протерозойскую эру.

Планетарный по своим масштабам и последствиям процесс эволюции Metazoa, возникновение новых форм животных, в том числе таксонов большого ранга, как следует из данных сравнительной эмбриологии, обусловлен наследуемыми изменениями индивидуального развития.

Анализ эмбрионального развития животных обнаруживает высокую степень интеграции и взаимозависимости развивающихся зачатков зародыша. Сложный характер соподчиненности процессов дифференциации в раннем онтогенезе все же нельзя абсолютизировать. Выясняется, что развивающийся зародыш состоит из дискретных модулей --- морфогенетических полей, клонов определенным образом специфицированных клеток, имагинальных дисков, парасегментов и т. п. *Принцип модульной организации* (Riedl, 1978; Bonner, 1988; Gilbert et al., 1996) позволяет отдельным частям тела изменяться, практически не затрагивая функции других частей. Вызванное мутациями изменение развития одного модуля не обязательно ведет к изменению развития всех модулей одновременно, что резко повышает шанс на выживание претерпевшего мутацию животного и, таким образом, создает предпосылки для эволюционных преобразований. Принцип модульной организации распространяется не только на структуры зародыша, но и на генетические системы управления развитием. Например, изменение одной системы проведения сигнала в клетке не обязательно вызывает изменение других таких систем.

Наиболее широко известны три основных способа изменения развития:  
*разобщение* (диссоциация) процессов развития во времени и пространстве,  
*умножение частей* (дупликация) *с последующей их дивергенцией*, и, наконец,  
*замещение функции* той или иной структуры.

К изменениям индивидуального развития путем разобщения событий эмбриогенеза относятся гетерохронии, гетеротопии и изменения скорости роста частей тела.



Термин *гетерохрония* (от греч.  $\epsilon\tau\epsilon\rho\zeta$  --- другой,  $\chi\rho\omicron\nu\omicron\zeta$  --- время), введенный еще Геккелем, означает изменение сроков развития органа у данного вида относительно предковой формы. Гетерохронии обусловлены изменениями времени экспрессии регуляторных генов одного модуля относительно времени экспрессии генов другого модуля. Смещение закладки органа на более ранние этапы развития называют *акцелерацией* (от лат. *acceleratio* --- ускорение), тогда как обратный процесс называют ретардацией (от лат. *retardatio* – замедление). Рассматривая соотношение развития соматических структур и половых органов, Гулд (Gould, 1977) показал роль гетерохронии в возникновении пedomорфоза и неотении (таблица 14-1).

ТАБЛИЦА 14-1. Гетерохронии как фактор возникновения пedomорфоза и неотении (по Gould, 1977).

появления соматического признака	Изменение сроков развития репродуктивных органов		Результат
	Ускорение	Без изменения	
Ускорение	Без изменения	Акцелерация	
Без изменения	Ускорение	Пedomорфоз	
Задержка	Без изменения	Неотения	

*Гетеротопии* (от греч.  $\epsilon\tau\epsilon\rho\zeta$  --- другой,  $\tau\omicron\pi\omicron\zeta$  --- место) представляют собой изменения места закладки органов в эмбриогенезе, ведущие к формированию иного, чем у предковой формы, плана строения тела. Классическим примером гетеротопии может служить смещение у некоторых рыб (*Gobius capito*, *Lepadogaster* и др.) закладки брюшных плавников в переднем направлении, где они, срастаясь, образуют присоску, расположенную впереди от грудных плавников (рис. 14-1). Возникновение присоски имело адаптивный характер, и позволило занять прибрежный ареал в области приобья.

Возникновение многообразных вариантов общего плана строения тела в процессе эволюции часто обусловлено *аллометрией* (от греч.  $\alpha\lambda\lambda\omicron\zeta$  --- другой,  $\mu\epsilon\tau\rho\nu$  --- мера), т.е. неравномерным ростом частей тела. Изменение скорости роста определенной области тела в процессе эволюции может быть связано с

изменением чувствительности клеток данной области к факторам роста, или же интенсификацией синтеза этих факторов в определенный момент времени. Полагают, например, что образование однопалой конечности лошади в процессе эволюции было обусловлено формированием механизма аллометрического роста среднего пальца конечности (Wolpert, 1983; Gilbert, 2000).

Многие эволюционные преобразования плана строения тела связаны с *умножением* частей тела. Впервые на полимеризацию, как на ведущий принцип эволюции, обратил внимание выдающийся петербургский зоолог В.~А.~Догель (Dogiel, 1929; Догель, 1954). Дупликация частей создает избыточность элементов, что делает возможной их дивергенцию без утраты функций, которую они выполняли у предковой формы. Вместе с тем, наличие множественных гомологичных структур создает предпосылки для олигомеризации, лежащей в основе прогрессивной эволюции многих Metazoa (Догель, 1954).

Дупликация и последующая дивергенция множественных элементов происходит не только на морфологическом, но и на молекулярном уровне. Дупликация анцестрального гена лежит в основе формирования многих семейств генов, в частности, семейства Нох-генов, суперсемейства TGF- $\beta$ , генов Myo-D, и многих других (рис. 14-2).

Наконец, в ходе эмбриогенеза может происходить *замещение функции*, или *кооптация*. При этом зачатки органов изменяют направление своей дифференциации, в результате чего развивающиеся из них органы приобретают возможность выполнять новую функцию сравнительно с функцией предковой формы. Предсуществующие структуры как бы кооптируются для выполнения новой функции. Например, некоторые элементы сомитов примитивных хордовых в ходе эволюции приобрели способность формировать в эмбриогенезе хрящевые, а затем и костные позвонки, что привело к появлению позвоночника, новой опорной структуры, заместившей хорду анцестральных форм.

Результаты изменения онтогенеза, происходящие в процессе исторического развития животных, сводятся к двум основным типам. При сопоставлении

развития животных, занимающих разные уровни филогенетического древа, обнаруживаются изменения, коренным образом преобразующие основной план строения животного. К такого рода кардинальным преобразованиям, которые ведут к возникновению новых типов животных, можно отнести появление в онтогенезе двухслойности, возникновение мезодермы, метамерности, переход от радиального типа симметрии к билатеральному, возникновение хорды и внутреннего скелета, жаберных щелей, черепа и т.п.

Наряду с этим в процессе эволюции часто происходит модификация существующих структур. Такая реорганизация органа обеспечивает выполнение новых функций, не свойственных предковой форме. Ярким примером этого может служить эволюция морфогенеза конечности позвоночных.

Чем объясняются эти эволюционные изменения плана строения организма и его органов? Часто говорят, что они возникают в результате процесса адаптации животного к условиям существования. Современное понимание проблемы позволяет отказаться от этой двусмысленной формулировки. В основе преобразований плана строения тела и органов лежат изменения генетических механизмов, управляющих индивидуальным развитием. Возникающие на основе случайных мутаций изменения структур и функций создают *предпосылки* для освоения новых условий существования, новых ниш, которые были недоступны для предковых форм. Вряд ли в этих случаях можно говорить об адаптации, о приспособлении, поскольку здесь речь идет о реализации возникшей *независимо от условий существования* возможности жить в определенной среде. Эволюция не столько приспособление к условиям среды, сколько ее освоение.

Воссоздание филогении животных --- крайне сложная проблема, и в этой области сложилась парадоксальная ситуация, когда родство между крупными таксонами признается всеми, но каждый понимает это родство по-своему, так что в настоящее время практически нет ни одной бесспорной филогенетической системы. Можно ли отнести губок к двухслойным животным? Являются ли сегментированные аннелиды предками членистых животных? Являются ли предками насекомых многоножки или ракообразные? Каким был предок

хордовых? Как возникли Amniota? Эти и многие другие вопросы филогении являются предметом страстных дискуссий. Среди многих причин такого состояния нельзя не отметить неполноту наших современных знаний о существе процесса, требующего разностороннего анализа, включая анализ эволюции генов и генных систем, которые определяют характер и особенности индивидуального развития.

Идея о том, что эволюция признаков взрослых форм обусловлена изменениями хода онтогенеза, имеет давнюю историю. Одним из первых обратил внимание на это известный зоолог и эмбриолог Фриц Мюллер (1863). В.~Гарстанг, оспаривая биогенетический закон Геккеля, выдвинул тезис о том, что «онтогенез не повторяет филогенез, но творит его» (Garstang, 1922).

Представление о значении изменений онтогенеза для эволюционного процесса животных было развито в теории филэмбриогенеза А.~Н.~Северцова. Первые наброски этой теории были опубликованы А.~Н.~Северцовым еще в 1910 г. Позднее им и его учениками были проведены обширные сравнительно-эмбриологические исследования, на основании которых в 1949 г. была сформулирована окончательная версия теории филэмбриогенеза, как попытка решения вопроса о том, «как происходят и в какой период индивидуальной жизни возникают те изменения органов, которые ведут к филогенетическому преобразованию строения взрослого организма» (Северцов, 1949).

Северцов различает три основных способа филогенетического изменения органов в ходе индивидуального развития. Изменения, происходящие в конце периода морфогенеза, он называет *надставкой конечной стадии онтогенеза* или *анаболией* (от греч. *αναβολή* --- удлинение).

Исследуя развитие некоторых рыб из семейства сарганообразных, Северцов установил наличие двух добавочных стадий развития челюстного аппарата у *Belone acus* по сравнению с родственными формами. На ранних стадиях развития нижняя челюсть *Belone* лишь слегка выступает вперед сравнительно с верхней (рис.14-3). Позднее, нижняя челюсть интенсивно растет, благодаря

чему возникает форма, характерная для рыб из семейства Полурыловых (рис.14-4). Однако, затем происходит еще одна надставка онтогенеза, в ходе которой теперь уже верхняя челюсть быстро растет и вместе с нижней образует длинное прямое рыло (рис.14-5).

Другой способ филэмбриогенеза --- *девиация* (от лат. *deviatio* - отклонение от пути) состоит в изменении развития органа на средних стадиях онтогенеза. В качестве примера девиации Северцов рассматривает филогенетическое развитие чешуи у рептилий. Начальные стадии закладки роговых чешуй рептилий сходны с закладкой плакоидных чешуй акул (рис.14-6). В обоих случаях происходит утолщение эпидермиса, под которым образуется сгущение мезодермы. Позднее, однако, чешуя рептилий и рыб развивается разным способом. У рептилий ключевым элементом формообразования чешуи служит эпидермис. У акул --- плакоидная чешуя представляет собой продукт дифференциации мезодермы.

Третий модус филэмбриогенеза состоит в изменении начальных стадий морфогенеза. Этот способ был назван *архаллаксом* (от греч. *αρχη* --- начало; *άλλαχη* --- иначе). Так, видоизменение числа мезодермальных сегментов туловища в разных классах позвоночных могло произойти, по Северцову, путем изменения первоначальной закладки этих метамеров в эмбриогенезе.

Труды А.~Н.~Северцова и его школы сыграли важную роль в обосновании тезиса о примате онтогенетических изменений для филогенеза. Конечно, в настоящее время проблема взаимоотношений индивидуального развития и филогенеза вышла далеко за пределы морфологических исследований и решается с учетом современного понимания закономерностей эволюции генетических систем, управляющих развитием, о чем речь пойдет во втором томе этого издания. Здесь же, заключая первый том, мы на основании данных описательной эмбриологии попытаемся обрисовать поступательный ход эволюции многоклеточных животных, обусловленный последовательными изменениями индивидуального развития. Эту попытку не следует воспринимать как утверждение непреложности описываемого сценария. Наша задача состоит лишь в том, чтобы подчеркнуть творческую роль изменений индивидуального

развития в возникновении новых видов и более крупных таксонов, обратить внимание на то, что предпосылки эволюции Metazoa создаются на основе эволюции их онтогенеза.

В основании филогенетического дерева (рис. 14-7) располагаются анцестральные Metazoa, которые, судя по данным сравнительной эмбриологии губок и кишечнополостных, должны были иметь внеклеточный матрикс, молекулы клеточной адгезии и механизмы регуляции их экспрессии. Эти животные должны были обладать способностью к формированию эпителиальных пластов, иметь механизмы дезагрегации этих пластов на индивидуальные клетки. Первичные Metazoa, по-видимому, обладали способностью к эпителиальному морфогенезу, т.е. имели механизмы, обеспечивающие образование разного рода выпячиваний и выпячиваний эпителиального пласта. Судя по данным об эмбриональном развитии губок и кишечнополостных, анцестральные Metazoa имели также и регуляторные механизмы, контролирующие ингрессию клеток и обеспечивающие направленное движение клеточных масс. Нельзя не обратить внимания на то обстоятельство, что механизмы морфогенетических движений в ходе эволюции возникли раньше обособления эктодермальной и энтодермальной тканей (покровного кишечного пласта и пищеварительного фагоцитобласта), что подчеркивает независимость процессов пространственного распределения клеток и их спецификации в формирующемся зародыше.

Возникновение механизмов спецификации обособленных кишечного пласта и фагоцитобласта следует признать важнейшим этапом эволюции Metazoa. В индивидуальном развитии животных эта спецификация происходит вскоре после дробления. Клетки энтодермальной природы в результате разнообразных морфогенетических процессов (ингрессия, инвагинация, деламинация) формируют первичную кишку, которая сообщается с внешней средой при помощи лишь одного отверстия (бластопоральная кишка). Возникновение процесса гаструляции и формирование первичной кишки открыли новую страницу в эволюции Metazoa. В результате этого преобразования раннего онтогенеза возникли Двухслойные, объединяющие Стрекающих и Гребневиков. Формирование в онтогенезе древних Metazoa центрального органа

пищеварения, в составе которого появились особые железистые клетки, секретирующие пищеварительные ферменты, обеспечило переход от исключительно внутриклеточного (Губки) к смешанной форме пищеварения. Теперь наряду с внутриклеточным происходило и предварительное внеклеточное пищеварение в полости кишки (Стрекающие, Гребневики). По-видимому, это повысило эффективность пищеварения, и таким образом создало энергетические предпосылки, необходимые для возникновения механизмов активного движения. Теперь, на этом этапе эволюции, на основе случайных мутаций могли возникнуть, и действительно возникли, соответствующие специфические структуры и функции, обеспечивающие активное движение животного.

Таким образом, двухслойность и появление механизмов специфической дифференциации клеток эктодермальной и энтодермальной линий послужили основой для дальнейшего поступательного движения эволюции.

Возникновение тканей внутренней среды и мышечных тканей стало одним из важнейших этапов эволюции Metazoa. Начальные этапы дифференциации этих тканей обусловлены, по-видимому, сигналами, запрещающими развитие клеточных линий, эктодермальной и энтодермальной природы. Именно это сходство начальных этапов спецификации тканей внутренней среды, мышечной ткани и экскреторных элементов позволяет говорить о третьем --- мезодермальном --- направлении эмбриональной дифференциации. Процесс возникновения мезодермы, имевший поистине критическое значение для эволюции многоклеточных, продолжался весьма длительное время. Как полагают, он должен был начаться еще до появления гребневиков (Peterson, Davidson, 2000).

Следующий ключевой этап эволюции животных связан с возникновением билатеральности. Проблема происхождения билатеральных животных является одной из дискуссионных проблем современной филогенетики. В последние годы все настойчивее высказывается идея о монофилетическом происхождении Bilateria, объединяющих первичноротых (Lophotrochozoa, Ecdysozoa) и вторичноротых животных (Deuterostomia).

Решение этой проблемы невозможно без анализа особенностей организации раннего онтогенеза. Для всех трех ветвей билатеральных, во всяком случае, для их низших форм, характерна ранняя спецификация клеточных линий, которая обусловлена как материнскими факторами, закономерно распределенными в пространстве яйцеклетки и благодаря этому создающими цитоархитектурные координаты развивающейся системы, так и взаимодействием бластомеров с помощью особых сигнальных молекул. Характерной особенностью этих животных следует признать раннюю экспрессию зиготических генов, которая происходит уже в период дробления. Учитывая, что такой тип организации онтогенеза характерен для аннелид, моллюсков, нематод, иглокожих и асцидий, можно сделать вывод о его первичности, поскольку для высших эшелонов билатеральных животных характерен иной тип организации онтогенеза, при котором на первый план выступает спецификация не отдельных клеток, а целых доменов зародыша (*региональная спецификация*).

Региональная спецификация или формирование пространственного паттерна (от англ. pattern --- форма, модель, рисунок) подразделяется на ряд последовательных этапов. Сначала с помощью некой системы сигналов, активирующих или репрессирующих соответствующие регуляторные гены, определяется поле, в рамках которого будет происходить формообразование. Следующий шаг связан с подразделением поля на отдельные участки, каждый из которых характеризуется транскрипцией специфических регуляторных генов и соответствует отдельным элементам формирующейся структуры. Наконец, происходит спецификация свойств этих элементов. Таким образом, в ходе развития сначала определяется предварительный контур будущей структуры, затем происходит членение общего поля на составляющие элементы и устанавливаются границы между ними. Последний этап региональной спецификации связан с окончательной детерминацией судьбы различных частей формирующейся структуры.

Процесс региональной спецификации не зависит от формирования клеточных линий и определяется особыми, не связанными со спецификацией клеток, сигналами. Следует отметить универсальный характер принципа региональной



спецификации, который обнаруживается при решении разнообразных задач и на разных стадиях развития. Он лежит в основе формирования общего плана строения тела взрослого животного, например, сегментации тела Дрозофилы. Вместе с тем он используется и при детерминации местоположения в точно определенном месте таких структур, как щетинки или иных часто микроскопических элементов паттерна.

Другой особенностью низших Bilateria является то, что у этих животных, как правило, развитие имеет непрямой характер, т.е. осуществляется в два этапа. На первом этапе в процессе эмбриогенеза формируется относительно просто устроенная личинка, способная к активному движению и питанию. План строения личинок заметно отличается от плана тела взрослого животного, которое формируется уже в процессе постэмбрионального развития, т.е. после выхода из яйцевых оболочек.

Личинки билатеральных животных с непрямым развитием двусторонне симметричны, построены из ограниченного числа клеток и имеют клетки всего примерно десяти типов, в том числе эктодермальные покровы, нервные, мышечные, мезенхимные, экскреторные клетки и энтодермальный эпителий.

Высказывается предположение (Peterson, Davidson, 2000), что возникновению современных билатеральных животных предшествовал длительный период эволюции. В течение долгого времени первичные Bilateria были представлены микроскопическими животными, морфология которых соответствовала личиночной стадии современных билатеральных. На протяжении эволюции параллельно шли два процесса. Во-первых, формировались отсутствовавшие ранее генетические системы, способные осуществлять региональную спецификацию. Во-вторых, возникли «резервные клетки» («set-aside cells»), т.е. клетки, которые не воспринимали сигналы, направляющие раннее эмбриональное и личиночное развитие. Можно предположить, что источником «резервных клеток» могла стать часть популяции клеток половой линии.

В пользу развиваемой гипотезы свидетельствуют данные о становлении в процессе филогенеза системы Нох-генов, которая играет исключительную роль

в региональной спецификации тела животного. На схеме (рис.14-7) видно, что у первичных Metazoa имелся один примордиальный Нох-ген. У Стрекающих обнаруживаются Нох-гены двух классов --- "передние" и "задние", которые возникли в результате дупликации анцестрального гена. Позднее, по-видимому, перед обособлением Гребневиков в геноме Metazoa образуется представитель центрального класса Нох-генов. Такая трехчленная структура системы Нох-генов сохранилась на протяжении всей последующей истории развития животных. На ее основе возникли многочисленные кластеры Нох-генов билатеральных животных, содержащие гены всех трех классов.

Согласно гипотезе Петерсона и Дэвидсона (2000), современные Bilateria возникли путем надстройки онтогенеза (анаболии) личинкоподобных древних первичнобилатеральных билатерально-симметричные животных. При этом кластер Нох-генов контролировал формирование передне-задней оси животных, а их рост обеспечивался за счет пролиферации резервных недифференцированных клеток. Таким образом завершилась эра микроскопических Bilateria, и открылись возможности для возникновения животных крупных размеров.

Предки билатеральных были радиально-симметричными животными с замкнутой пищеварительной системой. Согласно «радиальной модели головы» (Shankland, Seaver, 2000), переход к плану тела современных билатеральных мог произойти в результате асимметричной спецификации клеток одного из меридианов яйца радиального предка. Возникновение особой программы асимметричной спецификации в одном из квадрантов дробящегося яйца радиально-симметричного предка, по-видимому, стало важнейшим событием в эволюции многоклеточных, открыв путь к возникновению билатеральных животных. Туловище разрасталось, и его концевой отдел все более отдалялся от головной области. Возникло анальное отверстие, и кишка стала биполярной. Голова, однако, сохраняла черты радиальной организации.

Появление ануса и сквозной кишки привело к возникновению новой конструкции тела животного. Вместо орально-аборальной оси низших Metazoa появилась переднезадняя ось, совпадающая поначалу с анимально-вегетативной

осью яйца. Первичные билатеральные животные возникли, по-видимому, на основе форм с пелаго-бентосным жизненным циклом, т.е. форм, имевших пелагических личинок, а во взрослом состоянии ведущих придонный образ жизни. Ползание по дну явилось своего рода предпосылкой для отбора форм с дифференциацией на спинную и брюшную сторону, и, кроме того, способствовало отбору двусторонне-симметричных индивидов (В. Н. Беклемишев, 1964). Действительно, выравнивание давления водной среды на левую и правую стороны продольно движущегося животного должно было сделать это движение более эффективным, способствуя увеличению скорости, относительному снижению энергетических затрат и т.д.

Как полагают, дробление у Архибилатерий не было детерминировано и не имело устойчивого характера. Благодаря этому они могли дать начало животным с разными типами дробления --- спиральным, билатеральным и радиальным (О.М. Иванова-Казас, 1995). Основой формирования спирального, радиального и билатерального типов дробления, как можно предполагать, стало возникновение клеточных механизмов, которые обеспечивали фиксацию положения веретена деления дробления относительно анимально-вегетативной оси яйца.

Возникновение спирального типа дробления с особыми механизмами пространственного распределения цитоплазматических факторов спецификации клеток, и клетками-родоначальницами различных клонов (трохобласты, первый и второй соматобласты и др.), занимающими строго определенное положение в пространстве, дало начало животным с личинками трохофорного типа.

Утрата ресничных покровов и появление способности к выработке хитиновой кутикулы и экзоскелета у некоторых Архибилатерий создали основу для появления особой ветви билатеральных животных Ecdysozoa, развитие которых сопряжено с линьками.

Смещение закладки ротового отверстия в переднем направлении открыло новые возможности в эволюции генерального плана строения тела. В частности, это перемещение освободило нейрогенную сторону зародыша от структур

пищеварительного тракта. Благодаря этому в нейрогенной области стало возможным формирование проходящей вдоль всего тела, включая головной отдел, опорной структуры --- хорды. Вместе с тем, смещение ротового отверстия на контрнейрогенную сторону повлекло превращение последней в брюшную сторону, обращенную к субстрату. Возникновение хорды --- теперь спинной струны --- послужило отправной точкой развития внутреннего скелета с образованием позвоночника и черепа, т. е. дало начало новой прогрессивной ветви эволюции Metazoa.

Начальные этапы этого процесса отмечены появлением бесчелюстных, а затем и челюстноротых позвоночных. Образование амниона и других зародышевых оболочек в сочетании с некоторыми другими изменениями онтогенеза послужило необходимой предпосылкой освоения суши вторичноротыми. На этом пути возникают рептилии, птицы и млекопитающие.