

«МИКРОМЕРНАЯ МОДЕЛЬ» МЕЖКЛЕТОЧНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ У РАННИХ ЗАРОДЫШЕЙ МОРСКИХ ЕЖЕЙ

Ю.Б.Шмуклер

Институт биологии развития им. Н.К.Кольцова, Москва

Ул. Вавилова, 26, конт. тел. (499) 135-0052, эл.почта ybs@hotmail.ru

Ключевые слова: морские ежи, эмбриогенез, деления дробления, изоляция бластомеров, микромеры, серотонин, протосинапс

Это направление работы было начато в 1977 году по инициативе и при активнейшем участии Левона Михайловича Чайлахяна. Данная публикация посвящается его памяти

Открытие Ханса Дриша способности изолированных бластомеров морского ежа формировать квазинормальные плутеусы (Driesch, 1891) стало в свое время одним из краеугольных камней биологии развития, дав основу для представлений о регуляции

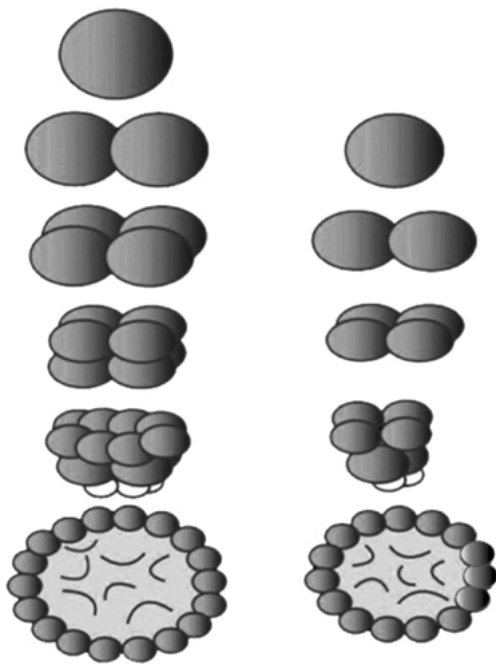


Рис. 1. Проспективная судьба изолированного бластомера морского ежа по Дришу и Гёрстадиусу

раннего эмбриогенеза. Опыты Дриша показали, что бластомеры, изолированные в период первых делений дробления, обладают тотипотентностью, которая, однако, ограничивается факторами, присущими интактному зародышу. Лежащей на поверхности причиной ограничения тотипотентности бластомера могло бы быть наличие у него сестринской клетки, что, однако, вступает в противоречие с классическими данными.

Способности формировать полноценные уменьшенные плутеусы не соответствует типу дробления зародышей, соответствующему половине целого зародыша – с формированием 2 микромеров (Driesch, 1891; Hörstadius, 1928, 1973) (Рис. 1). Эти данные стали основой концепции «микромерных часов», согласно которой момент неравномерного деления зародышей морских ежей обусловлен наступлением 4-го клеточного цикла, независимо от каких-либо воздействий –

обусловлен наступлением 4-го клеточного цикла, независимо от каких-либо воздействий –

фрагментации зародыша или изоляции бластомеров (Hörstadius, 1973; Czihak, 1973). Из этого вытекает, что развитие морских ежей на стадии делений дробления строго детерминировано, а процессы, восстанавливающие «целостный» тип развития, реализуются позднее. Действительно, формирующиеся из таких половинных зародышей «открытые полубластулы» способны замыкаться, но этот процесс, очевидным образом, не связан с межбластомерными взаимодействиями в период делений дробления, а сведения о его механизмах в доступной литературе сведения отсутствуют.

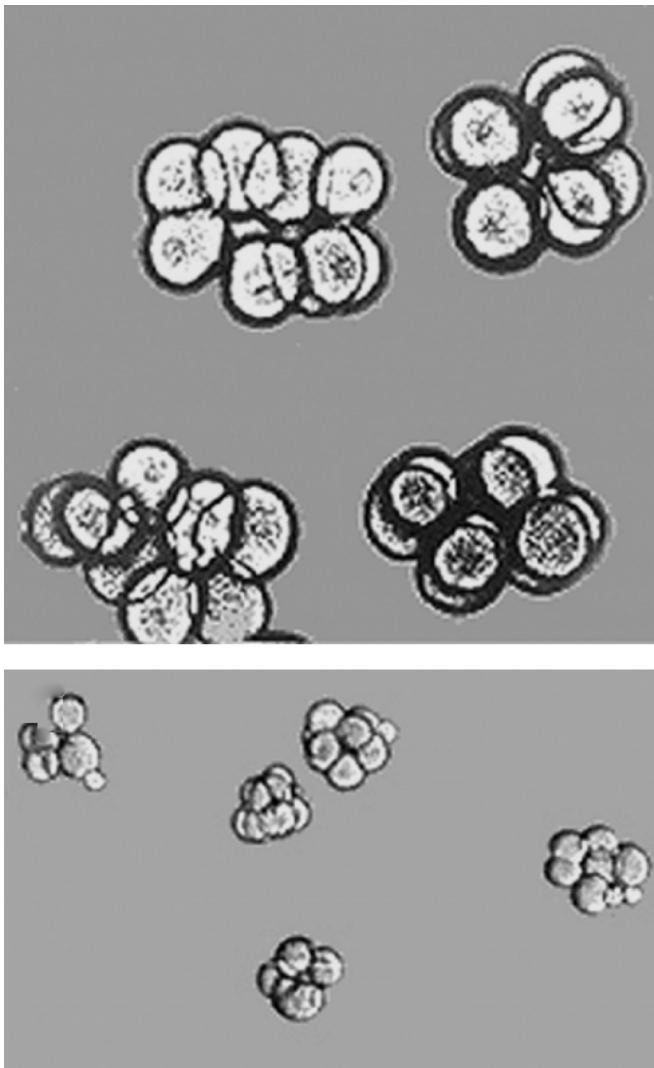


Рис. 2. Типы дробления половинных зародышей *S.mirabilis*.

А – 4-е деление дробления половинных зародышей *S.mirabilis*, изолированных до адгезии в 1-м делении дробления. Зародыши сформировали равные бластомеры.

Б – 4-е деление дробления половинных зародышей *S.mirabilis*, изолированных после адгезии в 1-м делении дробления.

Из противоречия между «частичным» типом дробления половинного зародыша и «целостным» типом формирующейся из него личинки вытекает либо неполнота этих данных, либо, как сформулировал Л.М.Чайлахян, «способность зародышей считать до четырех».

В то же время существовали данные, не укладывавшиеся в концепцию жесткой временной предопределенности момента формирования микромеров (Harvey, 1940; Dan, Ikeda, 1971). А первые же наши эксперименты по изоляции бластомеров *Strongylocentrotus nudus* и *Scaphechinus mirabilis* на стадиях 1-го или 2-го делений дробления продемонстрировали, что у половинных зародышей на 4-м делении дробления могут как формироваться микромеры, так и образовываться равные бластомеры (Шмуклер с соавт., 1981а)

(Рис. 2). Более того, позднее удалось изолировать ряд зародышей *S.mirabilis* по борозде 3-го деления дробления и 8 случаях из 100 наблюдать, что оба изолированных квартета бластомеров на 4-м делении дробления образуют 8 равных бластомеров (Божкова с соавт., 1982).

Уже в первых опытах по изоляции бластомеров, проведенные с помощью встряхивания на зародышах *S.nudus*, выявилась закономерность, согласно которой вероятность формирования микромеров в половинном зародыше на 4-м делении дробления тем выше, чем позже проводилась изоляция. Поэтому в дальнейшем изоляцию бластомеров выполняли датированно. Первая группа бластомеров изолировалась до адгезии после деления (Vacquier & Mazia, 1968), непосредственно после завершения

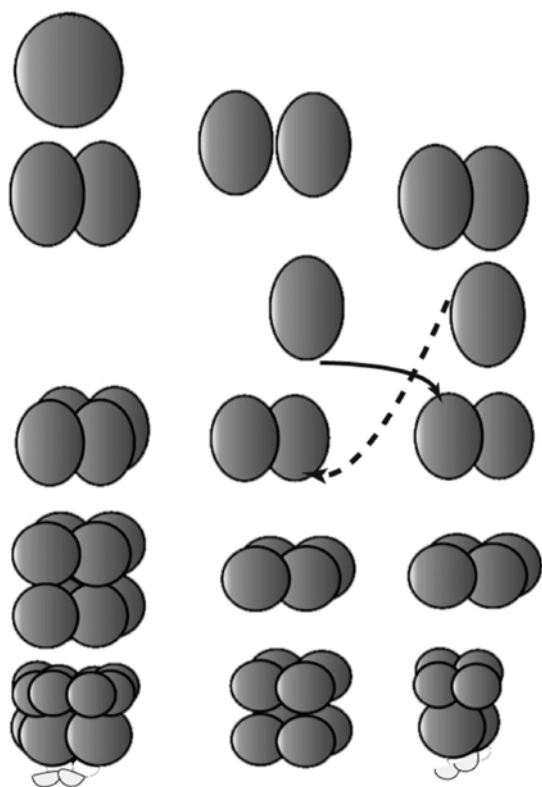


Рис. 3. Зависимость типа дробления половинных зародышей от момента изоляции
Стрелками показан эффект нейрофармакологических препаратов (см. ниже)
5-НТ – серотонин и его агонисты, анти-5-НТ – антагонисты серотонина

цитокинеза, когда бластомеры приобретали форму, близкую к сферической, а расстояние между сестринскими бластомерами достигало 10 мкм. Вторая группа бластомеров изолировалась после адгезии, когда межбластомерная щель резко уменьшалась, а сами бластомеры приобретали форму, близкую к полусферической. У полученных половинных зародышей контролировали момент формирования микромеров. Зародыши *S.mirabilis*, на которых легко доступна изоляция бластомеров с помощью микрохирургии, особенно удобны для таких экспериментов, поскольку это устраняет неопределенность, связанную с несинхронностью развития популяции зародышей, при изоляции с помощью встряхивания.

В данной работе приведены накопленные за длительный период экспериментальные данные по датированной изоляции бластомеров у морских ежей *Strongylocentrotus nudus*, *S. intermedius*, *Scaphechinus mirabilis*,

Echinocardium cordatum (Японское море, бухты Витязь и Троица, Россия) и *Paracentrotus lividus* (Средиземное море, Котор, Черногория и Неаполь, Италия).

На зародышах *S. nudus*, *P. lividus*, и, особенно, *S. intermedius* изоляция бластомеров была возможна только при дополнительной трехкратной отмывке бескальциевой морской водой и содержании в ней зародышей вплоть до начала 1-го деления дробления.

Сначала на зародышах *S. nudus*, а впоследствии и *S. mirabilis*, было показано, что изоляция бластомеров морских ежей до «адгезии после деления» (см. Vacquier & Mazia, 1968) в существенно большем проценте случаев приводила к формированию на 4-м делении дробления (когда неравномерное деление происходит у интактных зародышей) половинных зародышей, состоящих из 8 равных бластомеров, тогда как после адгезии – к неравномерному дроблению с формированием одного или двух микромеров (Табл. 1 - половинные зародыши, сформировавшие 1 и 2 микромера суммированы, см. также Рис. 3). (Шмуклер с соавт., 1981б). Разность долей половинных зародышей, формирующих микромеры на этой стадии, между изолированными до и после адгезии статистически достоверна (Табл. 2). Специальными опытами, которые проводила Т.Х.Найденко, было показано, что половинные зародыши с обоими типами дробления способны формировать плутеусы I (Шмуклер с соавт., 1981б).

Аналогичные результаты получены также на *P. lividus*, причем и на адриатической популяции, где у интактных зародышей превалировало формирование микромеров на 3-м, а не 4-м делении дробления, и на неаполитанской, где развитие шло по классическому типу (Шмуклер, 1992; Shmukler et al., 2008). Вероятно сходная ситуация существует и на зародышах *E. cordatum*, где хрупкость бластомеров, их малых размер и быстрая адгезия практически исключают возможность изоляции после адгезии, однако, изолированные до адгезии бластомеры, подтверждают результаты, упомянутые выше. Единственное исключение из всех исследованных нами видов представляет *S. intermedius*, где формировалось лишь небольшое количество равномерно дробящихся на 4-м делении половинных зародышей. Таким образом, есть основания предположить, что равномерное деление половинных зародышей более или менее универсально, тем более, что одним из объектов наших экспериментов являлся *P. lividus*, использованный во множестве классических исследований.

Таким образом, в ходе 1-го, 2-го, вероятно, 3-го делений дробления морских ежей существуют относительно короткие (несколько минут) периоды времени (до полного завершения «адгезии после деления»), в течение которых дальнейший тип дробления переопределяется с «целостного» на «частичный», то есть, в конечном счете, ограничивается тотипотентность бластомеров. Косвенно это подтверждается и опытами, в которых бластомеры зародышей *S. mirabilis* последовательно подвергались изоляции до адгезии в 1-м, 2-м и 3-м делениях дробления, что приводило к прогрессивному снижению доли неравномерно дробящихся на 4-м делении дробления уменьшенных зародышей (Чайлахян, Шмуклер, 1980). В этих экспериментах при двукратной изоляции (до адгезии в 1-м и 2-м делениях) микромеры формировались одновременно с контролем у $21,0 \pm 4,5\%$ зародышей, а при трехкратной – лишь у $7,6 \pm 0,7\%$ уменьшенных зародышей. При этом у половинных зародышей, изолированных в этих же опытах после адгезии в 1-м делении, частота формирования микромеров на 4-м делении дробления оставалась обычной для наших опытов.

Аналогичные опыты на зародышах *P. lividus* показали, что только $11,1 \pm 6,0$ подвергшихся последовательной изоляции в ходе 1-го и 2-го делений дробления уменьшенных зародышей формируют микромеры одновременно с интактными, т.е. на $33,9 \pm 6,2\%$ ($p < 0,001$) меньше, чем зародыши, изолированные только до адгезии в 1-м делении дробления. Такое «накапливание» эффекта устранения нормальных межбластомерных взаимодействий свидетельствует, с одной стороны, в пользу их значимости в определении типа раннего развития, а с другой – о повторяемости этих процессов в раннем развитии.

Рассматриваемый повторяющийся процесс, помимо того, что он опосредован межклеточными взаимодействиями, является также реципрокным и несинхронным. Действительно, если процессы, определяющие формирование микромеров, обусловлены исключительно внутриклеточными факторами и не зависят от межбластомерного обмена информацией, то при изоляции бластомеров независимо от ее срока наблюдалось бы неравномерное 4-е деление дробления в 100% случаев. Однако, в 142 случаях удалось пронаблюдать развитие пар половинных зародышей *S. mirabilis*, изолированных на стадии 1-го деления дробления из одного и того же материнского. В 97 случаях (68,3%) тип

дробления таких «близнецовых» зародышей совпадал (приблизительно в равных количествах – равномерно и неравномерно делящиеся), но в остальных случаях различался.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют, что раннее развитие морских ежей не является строго преддетерминированным, а неравномерное деление дробления, когда впервые в развитии образуются клетки различных типов, является результатом ряда последовательных событий, реализующихся в ходе адгезии бластомеров в ходе каждого из делений дробления. Кстати, отчасти становится ясной причина, по которой в классических экспериментах выпала часть результатов – действительно, если изоляцию аккуратно производить после полного завершения деления, как ясно из приведенных выше данных, вероятность обнаружения равномерно делящихся половинных зародышей очень мала. Еще один фактор, который мог воспрепятствовать получению полной картины в классических опытах, состоит в видовой особенности зародышей *P. lividus* – это то, что попытки изоляции бластомеров в бескальциевой среде достаточно долго приводят к полному разрушению бластомеров, и становятся успешными только после адгезии бластомеров. Только в последнее время эту трудность удалось обойти заменой бескальциевой морской воды на нормальную непосредственно перед началом изоляции.

Выявление «недостающего» в классических данных Дриша и Гёрстадиуса феномена – способности половинных зародышей формировать на 4-м делении дробления 8 равных бластомеров, т.е. паттерн, соответствующий 3-му делению дробления интактного зародыша, во-первых, однозначно опровергает жесткую концепцию «микромержных часов». Во-вторых, это позволяет реконструировать механизм нормального развития, при котором в ходе каждого последовательного деления реализуются события, предопределяющие положение веретена, а, следовательно, и плоскости следующего деления дробления, что избавляет зародыш от необходимости «считать до четырех». Это происходит (или не происходит – при изоляции) в ходе адгезии после деления, когда в результате взаимодействия между бластомерами изменяется их форма и реализуется прямой обмен межбластомерными сигналами. Существование такого сигнала предположили Вакье и Мэзия (Vacquier & Mazia, 1968), которые в своих опытах впервые выделили этот критический период, что впоследствии было подтверждено и в

наших опытах с нейрофармакологическими препаратами (Бузников, Шмуклер, 1978). На самом деле, ситуация представляется еще более сложной, поскольку, как показала цейтрафферная регистрация (В.В.Смолянинов, личное сообщение), в ходе 2-го деления дробления происходит не только взаимодействие blastomeres по новой борозде дробления, но и сначала расхождение, а затем повторная адгезия их по борозде 1-го деления (Рис. 4).

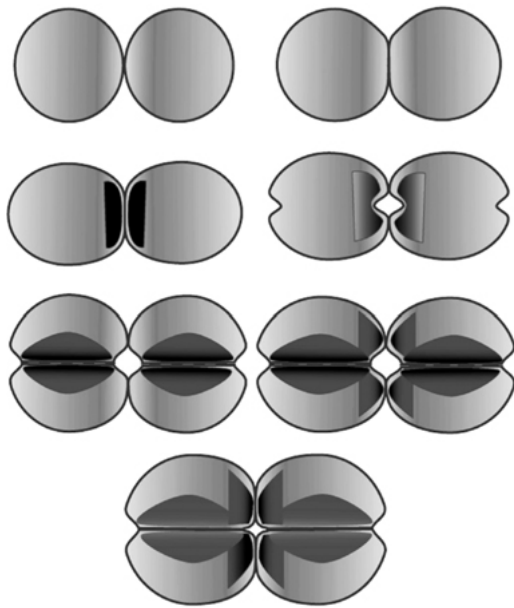


Рис. 4. «Повторное взаимодействие» blastomeres в ходе 2-го деления дробления морского ежа *S.nudus* (В.В.Смолянинов, личное сообщение)

Можно предполагать, что все более и более сложная с каждым делением геометрия взаимодействий blastomeres, перестройка их формы и свойств цитокортекса в конечном счете и обуславливает точное следование плоскостей деления в нормальном развитии, а после прохождения 3-й борозды дробления в экваториальной плоскости - вступление в силу фактора неоднородности цитоплазмы по анимально-вегетативной оси, что и приводит к неравномерному дроблению. Однако, все эти процессы в норме реализуются за счет наличия с сестринских клеток, и, таким образом, той или иной формы межклеточных взаимодействий.

Показанная нами закономерность паттернов дробления при датированной изоляции blastomeres морских ежей, получившая название «микромерной модели», оказалась в высокой степени продуктивной при исследовании механизма обнаруженных нами взаимодействий (см. ниже).

Следует отметить, что изоляция blastomeres до адгезии не однозначно определяет его перспективную судьбу, а, вероятно, вносит в нее элемент неопределенности, когда вместо закономерного в интактном зародыше, ориентация следующей борозды дробления определяется в той или иной мере случайными факторами. При этом, из наших опытов по воздействию некоторых химических веществ на паттерн дробления вытекает, что в цитокортексе существуют некоторые предпочтительные места закладки и завершения

борозды дробления – в некоторых случаях борозда 4-го деления закладывалась на вегетативном полюсе, как при формировании микромеров, однако затем мигрировала к центру бластомера и замыкалась там, образуя два равных бластомера.

Каков же может быть механизм собственно межбластомерных взаимодействий, способный таким образом влиять на паттерн дробления? Согласно одной из первоначальных гипотез предполагалось, что паттерн дробления обусловлен «геометрическими соображениями», т.е. исключительно изменениями формы бластомеров (Божкова с соавт., 1982), однако никаких специализированных структур в области контакта с помощью сканирующей электронной микроскопии обнаружено не было (Schroeder, 1988), более того, подчеркивалось, что контактная поверхность мало отличается на этом уровне от внешней части мембраны бластомеров. Во всяком случае, эта гипотеза в дальнейшем развития не получила, и в настоящее время отсутствуют какие-либо новые факты, которые позволили бы обсуждать ее.

В то же время многочисленные данные накопились о роли в межбластомерных взаимодействиях таких низкомолекулярных регуляторов донервного развития, как вещества, химически идентичные нейромедиаторам, в первую очередь – серотонин. Еще в опытах на интактных зародышах была показана способность антагонистов серотонина, внесенных в период деления дробления, вызывать эффекты, свидетельствующие о нарушении межбластомерных взаимодействий (Бузников, Шмуклер, 1978). Так что было логично проверить предположение о том, что медиаторы могут служить собственно межбластомерными посредниками, несмотря на то, что в свое время такая возможность в принципе и отрицалась (Бузников, 1977).

На описанной выше «микромерной модели» было исследовано действие агонистов и антагонистов нейромедиаторных рецепторов, исходя из предположения, что сами по себе медиаторы могут являться межбластомерным сигнальным веществом и, соответственно, способны имитировать естественные взаимодействия, а их антагонисты – устранять их. Контрольные эксперименты показали, что серотонин практически не влияет на тип дробления половинных зародышей, изолированных после адгезии, а его антагонисты, напротив, - на тип дробления, зародышей, изолированных до адгезии. Поэтому действие серотонина и других медиаторов исследовали на бластомерах

изолированных до адгезии, а их антагонистов – на изолированных после адгезии. Результаты этих экспериментов приведены в Табл. 3. Из них очевидно, что серотонин на всех исследованных видах статистически достоверно увеличивает долю половинных зародышей, которые на 4-м делении дробления формируют микромеры, аналогичный эффект на зародышах *P.lividus* продемонстрировал агонист серотонина квипазин. Триптамин на зародышах *S.mirabilis* имел сходный с серотонином эффект, тогда как другие исследованные медиаторные вещества на тип дробления половинных зародышей влияния не оказывали.

С другой стороны, антагонисты серотонина, как явствует из Табл. 3, обладают статистически достоверным эффектом на половинные зародыши, изолированные после адгезии, существенно увеличивая долю зародышей, формирующих на 4-м делении дробления равные бластомеры, при том, что антагонисты других медиаторов достоверного эффекта не имели. Существенно, что наряду с легко проникающими в клетки антагонистами, являющимися третичными аминами, на «микромерной модели» оказались высоко эффективными и их четвертичные аналоги. Это свидетельствует о возможной локализации соответствующих рецепторов на поверхностной мембране, и было одним из первых физиологических феноменов, связанных с мембранной, а не внутриклеточной рецепцией у ранних зародышей, которая длительное время считалась специфической чертой медиаторного процесса в раннем эмбриогенезе (Buznikov, 1990).

В частности, инмекарб и его йодметилат (оба – в концентрации 25 мкМ) достоверно снижали долю половинных зародышей *S. mirabilis*, формирующих микромеры на 4-м делении дробления. На зародышах *P.lividus* инмекарб (50 мкМ) не влиял на паттерн дробления, тогда как йодметилат инмекарба (40 мкМ) уменьшал долю неравномерно дробящихся зародышей (Табл. 3). Сходные результаты были получены и с другими парами препаратов – антагонистов серотонина: КЮР-14 (100 мкМ) (производное индола) не влиял на тип дробления половинных зародышей, тогда как его йодметилат в той же концентрации существенно уменьшал частоту формирования микромеров. Также, йодметилат 3-тропанилиндол карбоксилата вызывал на половинных зародышах *P.lividus* вдвое больший эффект, чем его гидрохлорид. То есть, препараты, предпочтительно взаимодействующие со структурами поверхностной мембраны, оказались более

эффективными, чем их аналоги, легко проникающие в клетку, что заставляет предположить, что соответствующие рецептивные структуры в данном случае локализованы на поверхностной мембране. Отметим, что, если время инкубации с нейрофармакологическими препаратами – третичными аминами – превышало 15 мин, на первый план выходило их цитостатическое действие, тогда как их йодметилаты такого эффекта не вызывали.

Эффекты серотонергических веществ на «микромерной модели» специфичны, поскольку одновременное внесение серотонина (или его агонистов) и его антагонистов давало результаты, очень близкие к получаемым в контроле – без фармакологических препаратов.

Наряду с серотонергическими препаратами чрезвычайно эффективно влияли на тип дробления половинных зародышей *S.mirabilis* также блокатор фосфодиэстераз папаверин и дибутирил-цАМФ. Таким образом, «микромерная модель» оказалась весьма продуктивной и селективной в поиске веществ, способных влиять на паттерн раннего дробления, и выявила способность, в первую очередь, серотонина и его агонистов имитировать межбластомерный сигнал и, соответственно, увеличивать долю половинных зародышей, развивающихся по «частичному» типу, а антагонистов – по типу «целого» зародыша половинного размера, когда деление, на котором произошла изоляция или имитирующее ее химическое воздействие, как бы «пропущено». Можно предположить, что эти эффекты соответствуют функции серотонергических веществ в интактном зародыше (Buznikov, Shmukler, 1978; Buznikov et al., 1980).

Конкретный механизм действия серотонина как непосредственного межбластомерного медиатора в раннем развитии может основываться на следующем. Ранее было показано, что вследствие малой активности моноаминоксидаз основным путем инактивации внутриклеточных медиаторов у ранних зародышей является их выброс во внешнюю среду (Buznikov, 1990). Соответственно, у ранних зародышей морских ежей продемонстрировано присутствие транспортера серотонина SERT (Бузников с соавт., 2005), а по гистохимическим данным концентрация серотонина в межбластомерном компартменте повышена (Markova et al., 1985). Утечка отсюда медиатора во внешнюю среду может быть затруднена как малыми размерами компартмента, так и присутствующими

здесь адгезивными контактами (Шмуклер с соавт., 1981б). Таким образом, в двухклеточном зародыше возникает асимметрия окружающей среды, а при наличии на поверхностной мембране соответствующих рецептивных структур, и существенно более высокая вероятность взаимодействия с ними молекул медиатора, даже если рецепторы распределены по поверхности бластомера равномерно. Взаимодействие медиатора и его рецепторов в контактной области бластомера тем или иным путем может изменить здесь состояние цитокортекса, что и обеспечивает впоследствии определенную ориентацию борозды следующего деления дробления. Этому соответствуют и данные о повышенной активности аденилатциклазы в области межбластомерного контакта (Ростомян с соавт., 1985).

Фармакологические данные в пользу существования мембранных серотониновых рецепторов, полученные на микромерной модели упоминались выше, а позднее они были подкреплены как в опытах по измерению уровня внутриклеточных ионов кальция (Shmukler et al., 1999) у *Lytechinus pictus*, так и при фиксации потенциала на мембране бластомеров *P.lividus* (Shmukler & Tosti, 2002). Все это позволило сформировать (Шмуклер, 1992), а затем и уточнить гипотезу «протосинапса» как двухсторонне-симметричной структуры, в которой оба бластомера являются: 1) источником сигнального вещества (медиатора), 2) его мишенью и 3) пассивным препятствием для утечки медиатора из межбластомерного компартмента во внешнюю среду (Рис. 5).

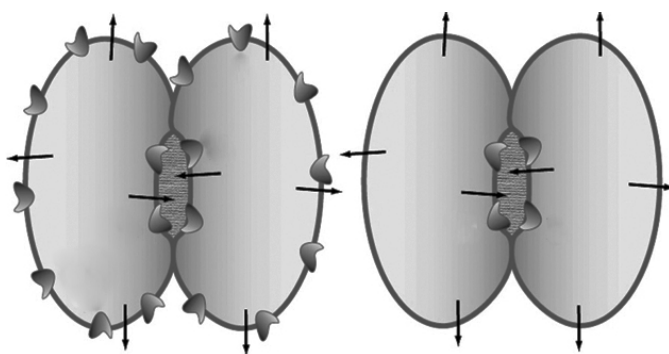


Рис. 5. Протосинапс
 Слева – схема протосинапса при равномерном распределении медиаторных рецепторов
 Справа – схема протосинапса с учетом локализации медиаторных рецепторов в области межбластомерного контакта

R – мембранный медиаторный рецептор, стрелки – выброс медиатора во внешнюю среду. Межбластомерный компартмент выделен штриховкой, в нем накапливается медиатор

Недавние эксперименты в условиях whole-cell patch-clamp показали, что локальная аппликация агонистов серотонина в межбластомерную щель зародышей *P.lividus* вызывает специфические входящие токи, которые обладают большей амплитудой, а, главное, существенно меньшим латентным периодом, чем при аппликации на

свободную поверхность бластомеров (Shmukler et al., 2008). Это дало основание предположить, что серотонин-рецептивные структуры локализованы именно в межбластомерном компартменте, и уточнить представления о протосинапсе (Рис. 5). В настоящее время нами начаты работы по молекулярно-биологическому исследованию рецепторного звена рассматриваемого процесса (Никишин в соавт., 2009).

Концепция протосинапса продуктивна, в частности, поскольку позволяет объяснить сумму имеющихся данных, связанных с межклеточными взаимодействиями в раннем развитии. В частности, в классическом опыте Дриша, как можно полагать, изоляция осуществлялась уже после того, как произошло межбластомерное взаимодействие со всеми упомянутыми выше последствиями. Еще более классический опыт Вильгельма Ру (Roux, 1888), который до сих пор расценивают как артефакт (Gilbert, 2006), не противоречит концепции протосинапса и его результат объясняется тем, что некротизированный бластомер лягушки *in situ* мог служить препятствием для утечки медиатора из межбластомерного компартмента, и, таким образом, для интактного бластомера ситуация не менялась по сравнению с нормальным развитием.

Наконец, предложенный механизм протосинапса может лежать и в основе возникновения многоклеточности как суммы асимметричных клеток с тем упрощением по сравнению с концепцией Вольперта (Wolpert, 1994), что исключает привлечение субстрата в качестве необходимого компонента для формирования клеточной неоднородности.

“MICROMERE MODEL” OF CELLULAR INTERACTIONS IN SEA URCHIN EMBRYOS

Yuri B. Shmukler

N.K.Koltzov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow

26 Vavilov St., Moscow, 117808, Russia, e-mail ybs@hotmail.ru

It was shown that isolation of sea urchins blastomeres before “post-division adhesion” leads mainly to the formation of equal blastomeres at 4th cleavage division whereas after adhesion – to the formation of micromeres simultaneously with intact embryos. Similar results were obtained in five sea urchin species. Conclusion was made on the existence of critical point in the cleavage process, when blastomeres exchange information, determining further cleavage pattern.

It was shown in this “micromere model” that serotonin and its analogues influence the cleavage pattern of half embryos. These data became the base for the “protosynapse” hypothesis – double-side structure, where both blastomeres are the source and target of the signal, also as the passive obstacle for leakage of signal substance from the interblastomere cleft to the milieu. Such a structure is able to supply the primary asymmetry of the blastomeres. Micromere model may be useful for specific pharmacological screening.

Key words: sea urchin, embryos, cleavage divisions, blastomere isolation, micromere, serotonin, protosynapse

Литература

Божкова В.П., Николаев П.П., Петряевская В.Б., Шмуклер Ю.Б. (1982) Межклеточные взаимодействия у ранних зародышей морских ежей. IV. Пространственная ориентация плоскостей деления бластомеров. *Онтогенез*, **13**, 6, 596-604

Бузников Г.А. (1977) Моноамины и ацетилхолин как регуляторы процесса эмбриогенеза - основные итоги и перспективы исследований. В кн: *Проблемы экспериментальной биологии*. с. 304 - 310, М., Наука

Бузников Г.А., Шмуклер Ю.Б. (1978). Влияние препаратов-антимедиаторов на межклеточные взаимодействия у ранних зародышей морских ежей. *Онтогенез*, 9 (2): 173-178

Бузников Г.А., Ракич Л., Кудряшова Н.И., Овсепян Т.Р. и Хромов-Борисов Н.В. (1980) Стратифицированные зародыши морского ежа *Arbacia lixula* как модель для выявления межклеточных взаимодействий. *Онтогенез*, **11**, 4, 411 - 416

Чайлахян Л.М., Шмуклер Ю.Б. (1980) Применение техники изоляции бластомеров для изучения роли серотонинергической системы в ранних межклеточных взаимодействиях. Тез. докл. III Всес. конф., посв. 80-летию акад. Арм. ССР, чл.-корр. АН СССР Х.С.Коштоянца "Физиология и биохимия медиаторных процессов ", Москва, с. 211

Шмуклер Ю.Б., Чайлахян Л.М., Карпович А.Л., Харитон В.Ю., Квавилашвили И.Ш.. (1981a). Межклеточные взаимодействия у ранних зародышей морских ежей. I. Существование различных типов делений дробления зародышей половинного размера морских ежей. *Онтогенез*, **12**, 2, 197-201

Шмуклер Ю.Б., Чайлахян Л.М., Смолянинов В.В., Блюх Ж.Л., Карпович А.Л., Гусарева Э.В., Найденко Т.Х., Хашаев З.Х.-М., Медведева Т.Д. (1981b). Межклеточные взаимодействия у ранних зародышей морских ежей. II. Датированное механическое разделение бластомеров. *Онтогенез*, **12**, 4, 398 – 403

Шмуклер Ю.Б. (1992) Специфическое связывание $[H^3]$ 8-OH-DPAT ранними зародышами морского ежа *Strongylocentrotus intermedius*. *Биол. Мембр.*, **9**, 10-11, 1167-1169

Buznikov, G.A. (1990) Neurotransmitters in embryogenesis. Chur, Academic Press. 526 p.

Buznikov G.A., Peterson R.E., Nikitina L.A., Bezuglov V.V., Lauder J.M. (2005) The pre-nervous serotonergic system of developing sea urchin embryos and larvae: pharmacologic and immunocytochemical evidence. *Neurochem Res.*, 30(6-7), 825 - 837.

Czihak, G. (1973) The role of astral rays in early cleavage of sea urchin eggs. *Exptl Cell Res.*, 83(2): 424 – 426

Dan K., Ikeda M. (1971) On the system controlling the time of micromere formation in sea urchin embryos. *Develop., Growth & Differ.*, 13(4): 285 – 301

Driesch, H. (1891) Entwicklungsmechanische Studien. I. Der Werth der beiden ersten Furchungszellen in der Echinodermentwicklung. Experimentelle Erzeugung von Theil- und Doppelbildungen. *Z. wiss. Zool.*, 53(1): 160 - 184

Gilbert S.F. (2006) *Developmental Biology*, 6th Edition, Sinauer Associates, Inc., Publishers, Sunderland, Pt 1. Ch.3

Harvey, E.B. (1940) A new method of producing twins, triplets and quadruplets in *Arbacia punctulata* and their development. *Biol. Bull.*, 78, 2, 202 - 216

Hirstadius, S. (1973) *Experimental embryology of echinoderms*. Oxford, Clarendon Press, 192 pp.

Markova L.N., Buznikov G.A., Kovacević N., Rakić L., Salimova N.B., Volina E.V. (1985) Histochemical study of biogenic monoamines in early (prenervous) and late embryos of sea urchins. *Int. J. Dev. Neurosci.*, 3, 493 - 500

Nikishin D.A., Ivashkin E.G., Mikaelyan A.S., Shmukler Yu.B. (2009) Expression of serotonin receptors during early embryogenesis. *Simpler Nervous Systems*. St.Petersburg, Sept.13-17, (in press)

Roux W. (1888) Über die künstliche Hervorbringung halber Embryonen durch Zerstörung einer der beiden ersten Furchungszellen, sowie über die Nachtentwicklung (Postgeneration) der fehlenden Klüppelhälften. *Virchows Arch. Path. Anat. u. Phys.*, 114, 1, 419 - 521

Schroeder T.E. (1988) Contact independent polarization of the cell surface and cortex of free sea urchin blastomeres. *Dev. Biol.*, 125, 255-264

Shmukler, Yu.B., Buznikov, G.A., Whitaker, M.J. (1999) Action of serotonin antagonists on cytoplasmic calcium level in early embryos of sea urchin *Lytechinus pictus*. *Int.J.Dev.Biol.*, 42(3), 179-182

Shmukler Yu.B., Tosti E. (2002) Serotonergic-induced ion currents in cleaving sea urchin embryo. *Invertebr. Reprod. Dev.*, 42, 1, 43-49

Shmukler Yu.B., Silvestre F., Tosti E. (2008) 5-HT-receptive structures are localized in the interblastomere cleft of *Paracentrotus lividus* early embryos. *Zygote*, 16 (1), 79-86

Vacquier V.D., Mazia D. (1968) Twinning of sand dollar embryos by means of dithiothreitol. The structural basis of blastomere interactions. *Exptl Cell Res.*, 52, 2, 209 - 219

Wolpert L. (1994) The evolutionary origin of development: cycles, patterning, privilege and continuity. *Development*, Suppl., 79-84

Таблица 1

Влияние момента изоляции blastomeres на тип дробления половинных зародышей

Вид	Момент изоляции	Число зародышей	Доля половинных зародышей, сформировавших микромеры одновременно с интактными (в %%)	Достоверность
<i>S.mirabilis</i>	Д ₁	818	34,7±1,7	<0,001
	П ₁	865	68,2±1,6	<0,001
	Д ₂	60	30,0±6,0	<0,001
	П ₂	127	81,1±3,5	<0,001
<i>S.nudus</i>	Д ₁	56	23,2±5,6	<0,001
	П ₁	26	92,3±5,2	<0,001
<i>S.intermedius</i>	Д ₁	62	79,4±5,1	<0,001
	П ₁	48	83,3±5,4	<0,001
<i>E.cordatum</i>	Д ₁	22	27,3±9,5	<0,01
<i>P.lividus</i>	Д ₁	48	42,0±4,1	<0,01
	П ₁	42	76,2± 5,3	<0,001
<i>P.lividus*</i>	Д ₁	309	45,0±1,4	<0,001
	П ₁	214	93,4±1,0	<0,001

* адриатическая популяция с подавляющим преимуществом интактных зародышей, формирующих микромеры на 3-м делении дробления

Д – половинные зародыши, изолированные до адгезии в 1-м или 2-м делении дробления,
 П – половинные зародыши, изолированные после адгезии в 1-м или 2-м делении дробления

Таблица 2

Различие паттернов дробления половинных зародышей морских ежей, изолированных до и после адгезии в ходе 1-го или 2-го деления дробления

Вид	Сравниваемые стадии	Разность долей зародышей с одинаковым паттерном развития, изолированных в разные моменты	Достоверность
<i>S. mirabilis</i>	$D_1 - П_1$	$33,5 \pm 2,3$	$<0,001$
	$П_1 - D_2$	$38,2 \pm 6,2$	$<0,001$
	$D_2 - П_2$	$51,1 \pm 6,9$	$<0,001$
<i>S. nudus</i>	$D_1 - П_1$	$69,1 \pm 7,6$	$<0,001$
<i>S. intermedius</i>	$D_1 - П_1$	$3,9 \pm 7,4$	$>0,05^*$
<i>P. lividus</i>	$D_1 - П_1$	$24,2 \pm 6,2$	$<0,01$
<i>P. lividus</i> *	$D_1 - П_1$	$38,4 \pm 1,7$	$<0,001$

* достоверная разность отсутствует

Таблица 3

Эффекты химических веществ на тип дробления половинных зародышей морских ежей

Вид	Момент изоляции (в скобках – число половинных зародышей в данной серии)	Вещество	Концентрация [мкМ]	Изменение доли половинных зародышей, образующих микромеры одновременно с интактными (в %%)	Достоверность разности
<i>S. mirabilis</i>	Д ₁ (317)	Серотонин	55	+14 ± 4	<0,001
	Д ₁₂ (180)		55	+12 ± 6	<0,05
	Д ₁₂₃ (86)		55	+14 ± 4	<0,01
	Д ₁ (115)	Триптамин	250	+13 ± 6	<0,05
	Д ₁ (73)	Карбахол	275	- 8 ± 8	>0,05*
	Д ₁ (53)	АТФ	360	+ 3 ± 9	>0,05*
	Д ₁ (51)	Дофамин	260	+ 6 ± 10	>0,05*
	Д ₁ (84)	Папаверин	50	+34 ± 6	<0,001
	Д ₁ (101)	цАМФ	270	+ 7 ± 5	>0,05*
	Д ₁ (107)	цГМФ	270	- 8 ± 6	>0,05*
	Д ₁ (92)	Дибутирил-цАМФ	210	+ 41 ± 6	<0,001
	П ₁ (170)	Мелипрамин	5	-32 ± 5	<0,001
	П ₁ (77)	Ципрогептадин	60	-21 ± 6	<0,05
	П ₁ (85)	Инмекарб	25	-34 ± 8	<0,001
	П ₁ (62)	Инмекарб йодметилат	25	-26 ± 8	<0,001
	П ₁ (71)	Аминазин	15	- 3 ± 8	>0,05*
	П ₁ (64)	Пропранолол	135	+ 2 ± 7	>0,05*
	П ₁ (96)	Ганглерон	32	-10 ± 7	>0,05*
	П ₁ (48)	Квателерон	400	- 2 ± 9	>0,05*
	Д ₁ (86)	Валиномицин	5,4x10 ⁻³	+22 ± 9	<0,05
П ₁ (89)	Убаин	1000	-25 ± 9	<0,01	
П ₁ (70)	Трифтазин	49	-28 ± 13	<0,05	
<i>S.nudus</i>	Д ₁ (36)	Серотонин	112	+24 ± 12	<0,05
<i>P.lividus</i>	П ₁ (53)	Инмекарб	50	- 1 ± 12	>0,05*
	П ₁ (203)	Инмекарб йодметилат	40	-30 ± 10	<0,05
	П ₁ (27)	КЮР-14	100	0	>0,05*
	П ₁ (43)	КЮР-14 йодметилат	100	-17 ± 7	<0,05
	П ₁ (137)	Мелипрамин	60	-34 ± 4	<0,001
	П ₁ (97)	3-Тропанилиндол карбоксилат йодметилат	100	-25 ± 7	<0,001
	П ₁ (96)	3-Тропанилиндол карбоксилат гидрохлорид	100	-12 ± 1	<0,001
	П ₁ (82)	Квипазин	100	+24 ± 1	<0,001

* достоверная разность отсутствует

Обозначения Д и П – те же, что в Табл. 1