

ЦИТОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ РЕГУЛЯТИВНОГО РАЗВИТИЯ ИГЛОКОЖИХ И ДЕТЕРМИНИРОВАННОГО У МОЛЛЮСКОВ

© 2021 г. А. Л. Дроздов®

Национальный научный центр морской биологии имени А.В. Жирмунского ДВО РАН,
ул. Пальцевого, 17, Владивосток, 690041 Россия

®E-mail: anatoliyld@mail.ru

Поступила в редакцию 07.11.2020 г.

После доработки 19.11.2020 г.

Принята к публикации 26.01.2021 г.

Первичноротые (Protostomia) и вторичноротые (Deuterostomia) целомические животные имеют детерминированное (мозаичное) и регуляторное развитие. Эмбриогенез первичноротых не имеет тенденции к регуляции, которая напротив хорошо развита у вторичноротых. В наших работах была исследована способность иглокожих регулировать развитие, в том числе компенсировать влияние гравитационных полей на эмбриогенез. После центрифугирования зигот морского ежа в некоторых случаях бластула разделяется пополам и развиваются идентичные близнецы. Частота встречаемости близнецов коррелирует с жесткостью кортекса, которая определяется организацией кортикального цитоскелета яиц и эмбрионов. У хитонов и двустворчатых моллюсков близнецы после центрифугирования зигот не образуются, но в некоторых случаях развиваются полиэмбриональные элементы. В отличие от морских ежей, кортикальный цитоскелет у моллюсков окончательно формируется в овогенезе и не перестраивается при оплодотворении. Обсуждается морфогенетическая роль кортекса яиц и эмбрионов в регулятивном развитии Deuterostomia и детерминированном (мозаичном) развитии Protostomia.

DOI: 10.31857/S1026347021040065

Целомические животные принадлежат к двум эволюционным линиям: Protostomia и Deuterostomia. По современным оценкам эти ветви были разделены ~700 млн лет назад (рис. 1). Представители первичноротых имеют детерминированное (мозаичное) развитие, а у вторичноротых — регулятивное. Кроме того, представители этих двух групп различаются пятью основными признаками: 1) базовым характером дробления зигот (спиральное у первичноротых и радиальное у вторичноротых); 2) способом формирования мезодермы (телобластическое у первичноротых и энтероцельное у вторичноротых); 3) судьбой blastopora (остается первичным ртом у первичноротых и становится анусом у вторичноротых); 4) типом первичной личинки (трохофора у первичноротых и диплеврула у вторичноротых); 5) организацией нервной системы (брюшная нервная цепочка у первичноротых и дорзальная нервная трубка у вторичноротых). Кроме того, скелет вторичноротых мезодермального происхождения, а скелет первичноротых — эктодермального. Кожа вторичноротых является двухслойной: эктодермальный эпителий и мезодермальная соединительная ткань.

Цитологические основы существенных различий в механизмах эмбриогенеза животных с регулятивным и детерминированным развитием далеки от понимания. В эмбриологии популярна гипотеза о позиционной информации — системе морфогенетических детерминантов — морфогенов, распределенных в цитоплазме яйца и blastomeres, которые определяют дифференциацию эмбрионов (Равен, 1964; Дэвидсон, 1972; Корочкин, 1977; Schroeder, 1980; Левин, Шварцман, 1980; Левин, 1982; Wessels, 1982; Исаева, 1984). Локализация морфогенов создается в ходе овогенеза, а полностью стабилизируется после оплодотворения уже в цитоплазме зиготы или при первых делениях дробления. У некоторых животных ей может предшествовать т.н. цитоплазматическая сегрегация — интенсивные перемещения как поверхностной (кортикальной), так и внутренней цитоплазматической овоплазмы (Kirschner, Gerhart, 1981; Sawada, 1983; Sawada, Osanai, 1984; Преснов, Исаева, 1985; Sardet *et al.*, 1989; Shimizu, 1999). Существенную роль в локализации морфогенов и цитоплазматической сегрегации играет цитоскелет овоцитов, яиц и зигот. Это показано на модельных видах животных, принадлежащих к раз-

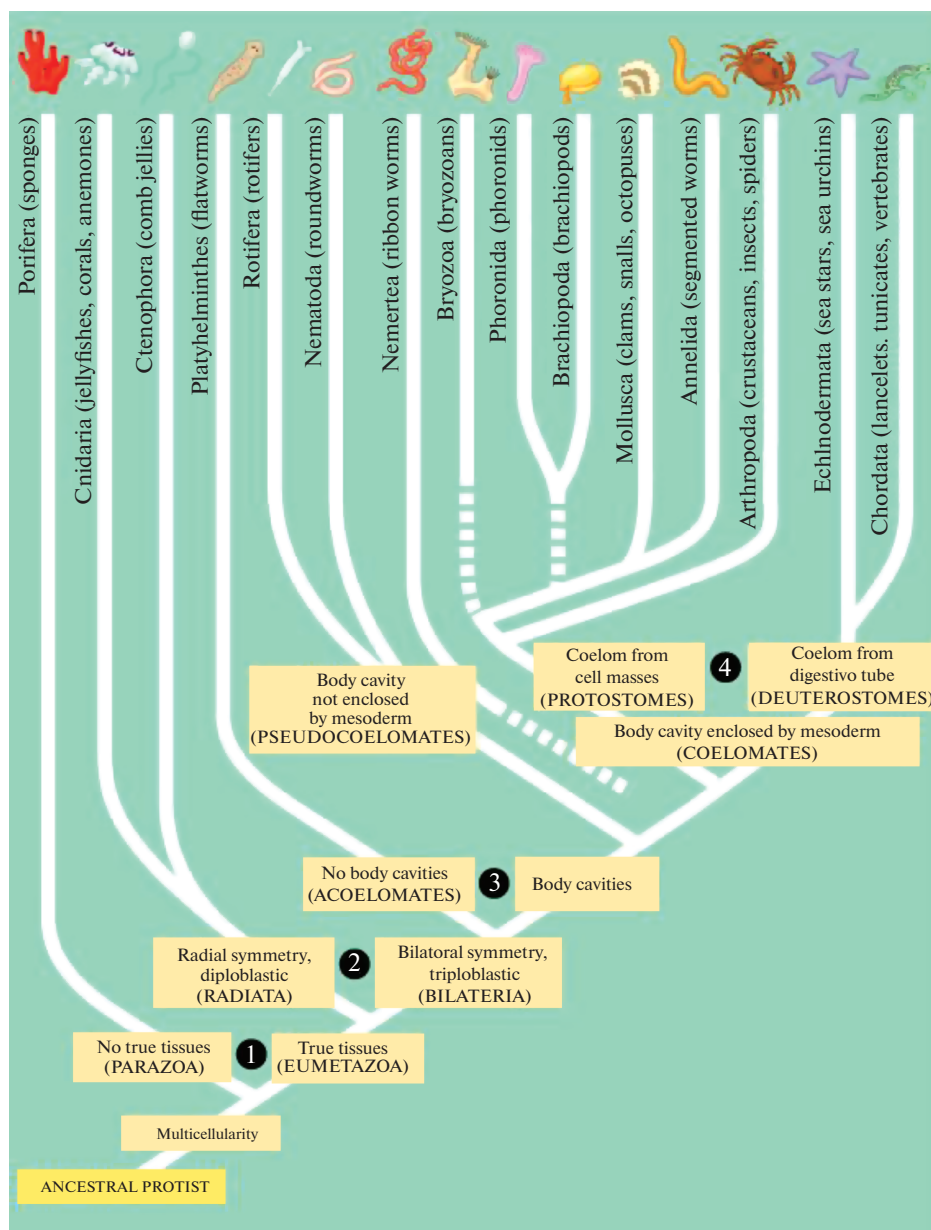


Рис. 1. Филогенетическое дерево многоклеточных животных. (Интернет ресурс: [https://www.mun.ca/biology/scarr/Phylogen of Animalia.html](https://www.mun.ca/biology/scarr/Phylogen%20of%20Animalia.html), посещение 16.11.2020).

ным таксонам: морских звездах (Santella *et al.*, 2014), лягушках (Geertje *et al.*, 1983), рыбах (Becker, Hart, 1999), дрозофил (Bearer, 1992) и других (Speksnijder *et al.*, 1990; Singer, 1992; Shimizu, 1999). Биохимический состав морфогенетических детерминантов до конца не изучен. Вероятнее всего они представлены рибопотеиновыми (РНП) частями (Исаева, 1984). Одним из подходов при изучении потенций эмбрионов к регулированию развития является исследование полиэмбрионии, т.е. формирование однойцевых близнецов. У некоторых животных экспериментальным путем уда-

валось получать до четырех однойцевых близнецов (Driesch, 1900; Loeb, 1909; Harvey, 1940). Эмбрионы морских ежей более полутора веков служат модельным объектом для изучения особенностей регулятивного развития животных. Ранее мы исследовали динамику развития близнецов при действии центрифугирования на оплодотворенные яйца морского ежа *Strongylocentrotus nudus* и ее связь с перестройками кортикального цитоскелета яиц (Дроздов, Святогор, 1987). Показано, что легче всего близнецы развиваются при центрифугировании зигот с 1-й по 6-ю мин развития (рис. 2).



Рис. 2. Однойцевые близнецы морских ежей. (а) — стадия поздней бластулы; (б) — личинка на стадии плутеуса. Масштаб: 50 мкм (по Дроздов, Святогор, 1987).

Через 10 мин после оплодотворения число близнецов, развивающихся после центрифугирования, заметно снижается. Через полчаса и до появления первой борозды дробления их можно получить, добавляя в среду алкалоид цитохалазин В, который разрушает актиновые микрофиламенты цитоскелета.

Эмбриогенез первичноротых не имеет тенденции к регуляции, которая хорошо развита у вторичноротых. Двустворчатые моллюски и хитоны являются первичноротыми животными, для которых характерно спиральное детерминированное развитие, называемое иногда “мозаичным”. Зародыш рассматривается как мозаика зачатков, преформированных уже в неоплодотворенном яйце. Нами (Дроздов, Святогор, 1989) исследовано развитие эмбрионов двустворчатых моллюсков, имеющих гетеро-квадрантное и гомоквадрантное дробление, центрифугированных в течение 5 мин при 2000 g в период от оплодотворения до первого деления дробления. Эмбрионы с гетероквадрантным дроблением гигантской устрицы *Crassostrea gigas* развиваются с образованием полярной лопасти, а эмбрионы мактры китайской *Macrta chinensis* — без образования полярной лопасти. Также нами исследовано яйцо хитона *Ischnochiton hakodadensis*, имеющее гомоквадрантное дробление. Использование этих трех видов моллюсков позволило сравнить возможности формирования близнецов у моллюсков при разных типах дробления. У всех трех видов отмечены случаи полиэмбрионии, проявляющиеся в развитии близнецовых уродств (рис. 3). Частота их появления не зависит от времени центрифугирования зигот, но ее можно повысить при центрифугировании в присутствии цитохалазина В. Центрифугирование яиц моллюсков в присутствии цитохалазина В (ЦхВ) в отличие от центрифугирования в морской воде без него приводит к более резкой стратификации яйцеклетки, к некоторому увеличению частоты появления aberrантных эмбрионов

и незначительному возрастанию доли близнецовых форм. Других внешне выраженных отличий зародышей, центрифугированных в ЦхВ, от зародышей, центрифугированных в морской воде без ЦхВ, отмечено не было.

Поскольку в работе многих авторов (обзор Исаева, 1984) показана существенная роль кортикального цитоскелета в распределении и механической фиксации морфогенетических детерминантов в яйцах и эмбрионах животных, мы исследовали цитоскелет кортекса неоплодотворенных и оплодотворенных яиц морских ежей и двустворчатых моллюсков. В кортексе неоплодотворенных яиц морского ежа *Strongylocentrotus intermedius* нами (Дроздов и др., 1987) выявлена редкая сеть коротких микрофиламентов и фибрилл различного диаметра, связанных друг с другом, с поверхностью кортикальных гранул и со сгущениями электронно-плотного материала.

После оплодотворения в яйцах морского ежа происходит реорганизация кортекса: в кортикальном слое происходит формирование мощного цитоскелета, и кортекс становится плотным и стабильным. В нем выявляются одиночные и собранные в пучки актиновые микрофиламенты. Выделяющееся в перивителлиновое пространство содержимое кортикальных гранул разбухает, формируя оболочку оплодотворения. Она пронизана выростами цитоплазмы — микроворсинками, которые армированы пучками микрофиламентов (рис. 4). Нами показано (Дроздов, 1989), что у мактры в неоплодотворенных яйцах существует мощная сеть, состоящая из пучков актиноподобных филаментов, хорошо выявляющихся при электронно-микроскопическом исследовании “тритоновых теней” яиц (рис. 5). После оплодотворения принципиальных изменений цитоскелета не происходит.

Таким образом, распределение морфогенов различается у первичноротых и вторичноротых. Оно определяется организацией цитоскелета, который

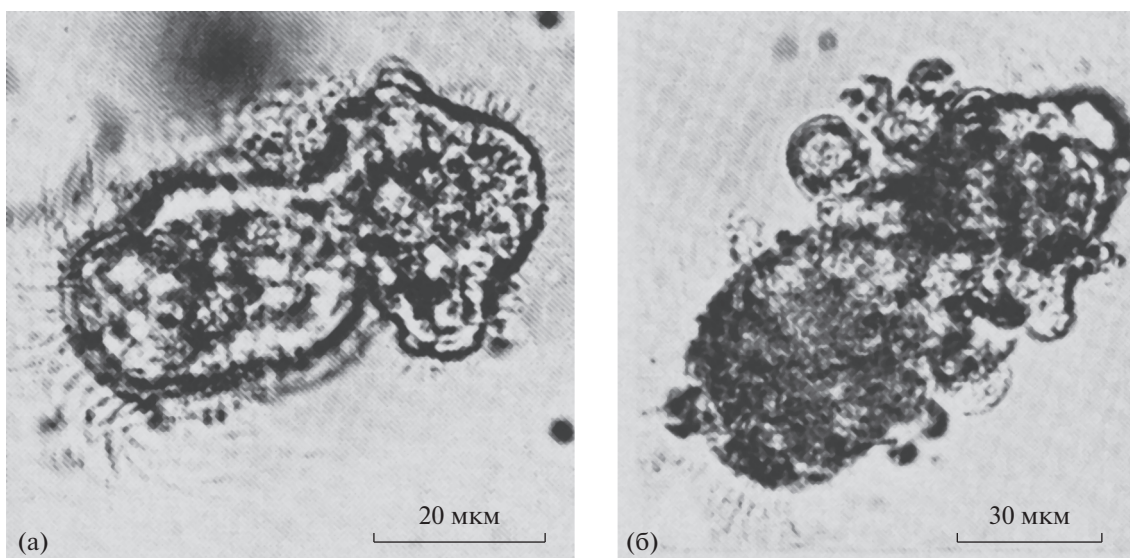


Рис. 3. Элементы полиэмбрионии после центрифугирования зигот устрицы (а) и мактры (б). Масштаб: (а) – 20, (б) – 30 мкм (по Дроздов, Святогор, 1989).

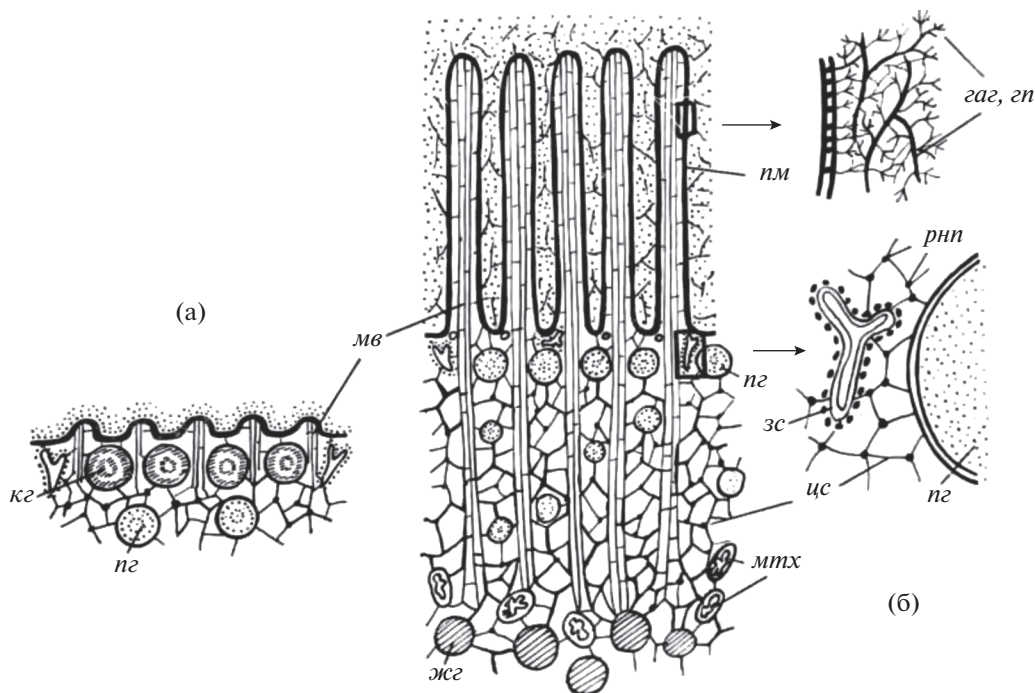


Рис. 4. Схема организации кортекса неоплодотворенного (а) и оплодотворенного (б) яиц морского ежа. *гаг, гп* – гликозаминогликаны и гликопротеины внеклеточного вещества яйцевых оболочек, *жг* – желточные гранулы, *кг* – кортикальные гранулы, *мв* – микроворсинки с пучком актиновых филаментов, *мтх* – митохондрии, *пг* – пигментные гранулы, *пм* – плазматическая мембрана, *рнп* – комплекс РНК с белком, *цс* – цитоскелетная сеть, связывающая мембранные органоиды и макромолекулярные комплексы кортикального слоя, *эс* – эндоплазматическая сеть с рибосомами (по Дроздов и др., 1987).

динамичен у эмбриона *Deuterostomia* и способен к перестройке, тогда как цитоскелет *Protostomia* является жестким и практически не изменяется во время оплодотворения и морфогенеза. Как следствие, морфогены занимают устойчивое положение

в яйцеклетке, зиготе и эмбрионе, строго определяя течение эмбриогенеза.

Возможно, одним из следствий таких различий в организации цитоскелета первичноротых и вторичноротых является поведение их клеток в

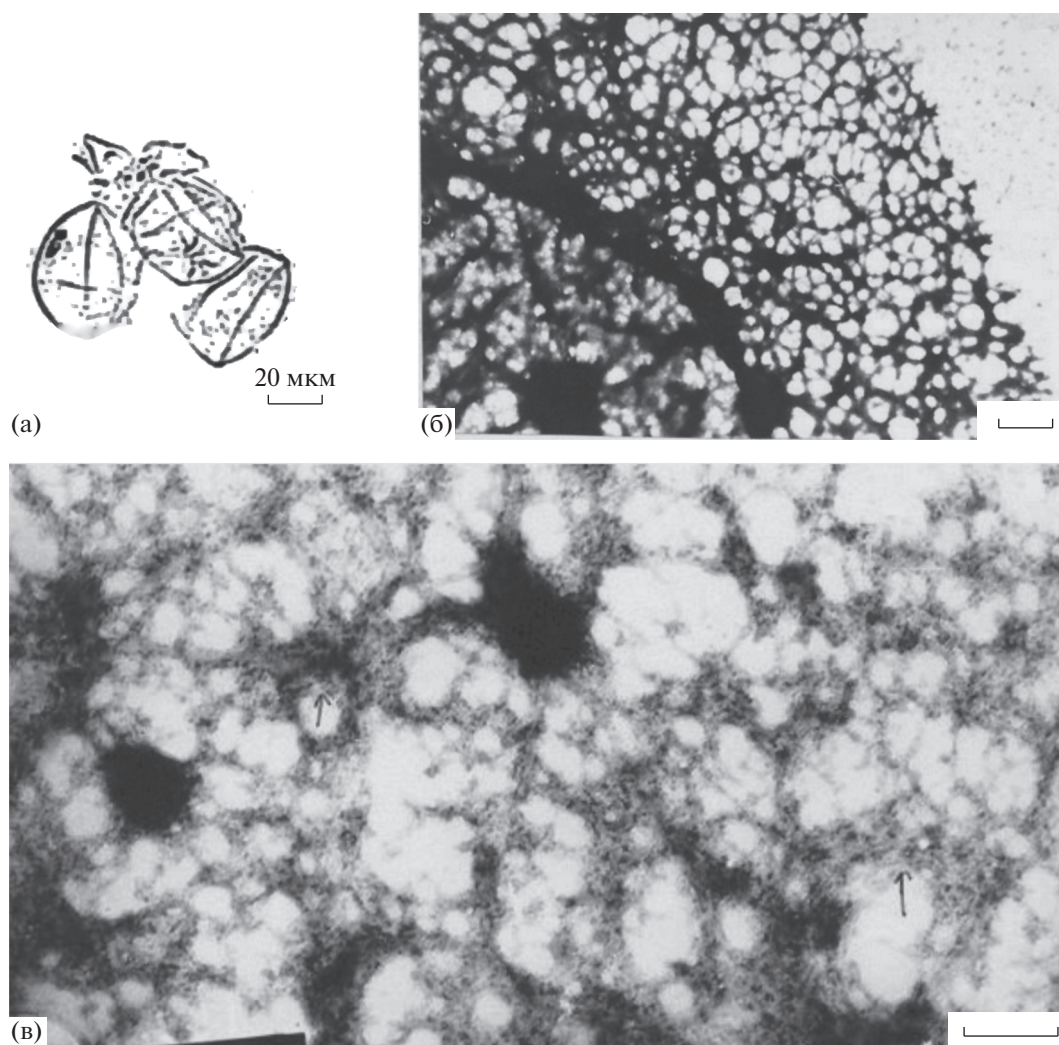


Рис. 5. Кортексы неоплодотворенных яиц мактры китайской. (а) — тритоновые “тени” в световом микроскопе, (б), (в) — в просвечивающем электронном микроскопе. Масштаб: (а) — 20, (б) — 0.2, (в) — 0.1 мкм (по Дроздов, 1989).

культуре. Клетки представителей типа хордовых сравнительно легко вводятся в культуру, которая широко применяется во многих биомедицинских и биотехнологических лабораториях по всему миру (Basic Cell Culture, 2002; Butler, 2003; Freshney, 2010; Animal Cell Culture, 2015 и др.). В то же время, несмотря на значительные за последние 50 лет усилия по введению в культуру клеток первичноротых животных, исследователи, как правило, ограничиваются наблюдениями за первичными культурами. Получать перевиваемые культуры практически не удается (Cai, Zhang, 2014; Potts *et al.*, 2020). Можно полагать, что эти различия в поведении в культуре клеток первичноротых и вторичноротых связаны с регуляторными потенциями их цитоскелета. Расхождения в организации цитоскелета произошли ~ 700 млн лет тому назад, и они определяют детерминированные и регуля-

тивные физико-химические особенности клеток и тканей этих двух главных ветвей царства многоклеточных животных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Дроздов А.Л. Кортикальный цитоскелет неоплодотворенных и оплодотворенных яиц мактры китайской // Цитология. 1989. Т. 31. С. 652–656.
- Дроздов А.Л., Исаева В.В., Подгорная О.И. Кортикальный цитоскелет неоплодотворенных и оплодотворенных яиц морского ежа // Цитология. 1987. Т. 29. С. 267–272.
- Дроздов А.Л., Святогор Г.П. Морфогенетическая роль кортекса в развитии близнецов у морского ежа // Онтогенез. 1987. Т. 18. С. 540–546.
- Дроздов А.Л., Святогор Г.П. Развитие центрифугированных яиц гигантской устрицы, мактры китайской и хитона // Онтогенез. 1989. Т. 20. С. 135–140.
- Дэвидсон Э. Действие генов в раннем развитии. М.: Мир, 1972. 342 с.

- Исаева В.В. О морфогенетической роли кортикального цитоскелета и плазматической мембраны яйцеклетки // Цитология. 1984. Т. 26. С. 5–13.
- Корочкин Л.И. Взаимодействие генов в развитии. М.: Наука, 1977. 280 с.
- Левин В.Л. К вопросу о детерминантах, действующих на первых этапах соматогенеза у дрозофилы // Цитология. 1982. Т. 24. С. 604–609.
- Левин В.Л., Шварцман П.Я. Новые данные о детерминации клеток в развитии дрозофилы (обзор литературы) // Цитология. 1980. Т. 22. С. 1259–1283.
- Преснов Е.В., Исаева В.В. Перестройки топологии при морфогенезе. М.: Наука, 1985. 191 с.
- Равен Х. Оогенез: Накопление морфогенетической информации. М.: Мир, 1964. 304 с.
- Animal Cell Culture*. Cell Engineering, 9. Ed. M. Al-Rubeai. Springer International Publishing Switzerland. 2015. 763 p.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-10320-4_21
- Basic Cell Culture, 2nd ed. Ed. J. M. Davis. Oxford University Press. 2002. 381 p.
- Bearer E.L. Cytoskeleton in Development // Curr. Top. Dev. Biol. 1992. V. 26. P. 1–7.
- Becker K.A., Hart N.H. Reorganization of filamentous actin and myosin-II in zebrafish eggs correlates temporally and spatially with cortical granule exocytosis // J. Cell Sci. 1999. V. 112. P. 97–110.
- Butler M. Animal Cell Culture and Technology. London: Taylor & Francis Group, 2003–2004. 256 p.
<https://doi.org/10.4324/9780203427835>
- Cai X., Zhang Y. Marine invertebrate cell culture: a decade of development. // J. Oceanography. 2014. V. 70. P. 405–414.
<https://doi.org/10.1007/s10872-014-0242-8>
- Driesch H. Die isolierten Blastomeren des Echinidenkeimes // Arch. Entwickl. mech. Organismen. 1900. Bd 10. S. 361–384.
- Freshney R.I., Culture of Animal Cells. A manual of basic technique and specialized applications. Wiley-Blackwell, 2010. 732 p.
<https://doi.org/10.1002/9780470649367>
- Geertje A.U., Hara K., Koster C.H., Kirschner M.W. Evidence for a functional role of the cytoskeleton in determination of the dorsoventral axis in *Xenopus laevis* eggs // J. Embryol. Exp. Morph. 1983. V. 77. P. 15–37.
- Harvey E.B. A new method of producing twins, triplets and quadruplets in *Arbacia punctulata* and their development // Biol. Bull. 1940. V. 78. P. 202–216.
- Kirschner M.W., Gerhart J.C. Spatial and temporal changes in the amphibian egg // Bio Science. 1981. V. 31. P. 381–388.
- Loeb J. Ober chemischen Bedingungen für die Entstehung einlanger Zwillinge beim Seeigel // Entwickl. mech. Organismen. 1909. Bd 27. S. 119–140.
- Potts R.W.A., Gutierrez A.P., Cortés-Araya Y., Houston R.D., Bean T.P. Developments in marine invertebrate primary culture reveal novel cell morphologies in the model bivalve *Crassostrea gigas* // PeerJ. 2020. V. 8. P. 9180.
<https://doi.org/10.7717/peerj.9180>
- Santella L., Limatola N., Chun J.T. Actin Cytoskeleton and Fertilization in Starfish Eggs // Sawada H., Inoue N., Iwano M. (eds.), Sexual Reproduction in Animals and Plants, Chapter 13. Springer Open. 2014. P. 141–156.
https://doi.org/10.1007/978-4-431-54589-7_13
- Sardet C., Speksnijder J., Inoue S., Jaffe L. Fertilization and ooplasmic movements in the ascidian egg // Development. 1989. V. 105. P. 237–249.
- Sawada T. How ooplasm segregates bipolarly in ascidian eggs // Bull. Mar. Biol. Station, Asamushi, Tohoku Univ. 1983. V. 17. P. 123–140.
- Sawada T., Osanai K. The cortical contraction related to the ooplasmic segregation in *Ciona intestinalis* eggs // W. Boux's Arch. Devel. Biol. 1984. V. 190. P. 208–214.
- Schroeder T.E. Expressions of the prefertilization polar axis in sea urchin eggs // Develop. Biol. 1980. V. 79. P. 428–443.
- Shimizu T. Cytoskeletal mechanisms of ooplasmic segregation in annelid eggs // Int. J. Dev. Biol. 1999. V. 43. P. 11–18.
- Singer R.H. The cytoskeleton and mRNA localization // Current Opinion in Cell Biology. 1992. V. 4. P. 15–19.
- Speksnijder J.E., Christian Sardet Ch., Jaffe L.F. The Activation Wave of Calcium in the Ascidian Egg and Its Role in Ooplasmic Segregation // J. Cell Biol. 1990. V. 110. P. 1589–1598.
- Wessells N.K. A catalogue of processes responsible for metazoan morphogenesis // Life Sci. Res. Reports. 1982. V. 22. P. 115–154.

Cytological Bases of Regulatory Development in Echinoderms and Determined in Molluscs

A. L. Drozdov[#]

Zhirmunsky National Scientific Center of Marine Biology, FEB RAS, Palchevsky St. 17, Vladivostok, 690041 Russia

[#]e-mail: anatoliyld@mail.ru

Protostomia and Deuterostomia coelomic animals have deterministic (mosaic) and regulatory development. The embryogenesis of the Protostomia have no tendency to regulation, which, on the contrary, is well developed in the Deuterostomia ones. In our works, the ability to regulate the development of echinoderms, including the effect of gravitational fields on embryos, was investigated. After centrifugation of the sea urchin zygotes, in some cases the blastula is split in half and identical twins develop. The frequency of twins correlates with cortex rigidity, which is determined by the organization of the cortical cytoskeleton of eggs and embryos. Whereas in chitons and bivalves, twins do not form after centrifugation of zygotes, but in some cases polyembryonic elements develop. and the deterministic development of Protostomia. Unlike sea urchins, the cortical cytoskeleton in mollusks is finally formed in oogenesis and does not rearrange during fertilization. The morphogenetic role of the cortex of eggs and embryo in the regulatory development of Deuterostomia and deterministic of Protostomia is discussed.