

© Коллектив авторов, 2019

DOI: 10.31088/2226-5988-2019-29-1-63-70

УДК 612.345; 616.379

# МИГРАЦИЯ НЕЙРОБЛАСТОВ И ФОРМИРОВАНИЕ ПАТТЕРНА ПЕРВИЧНЫХ НЕРВНЫХ СВЯЗЕЙ У *XENOPUS LAEVIS*

*С.В. Савельев, Н.В. Бесова, Е.С. Савельева, В.И. Гулимова*

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека», Москва

Исследованы миграция нейробластов на стадии нейруляции и образование первичного паттерна нервных связей головного мозга у шпорцевой лягушки (*Xenopus laevis*). В экспериментах было использовано 129 зародышей от стадии формирования нервной пластинки до начала активного питания вылупившихся личинок. Для исследования миграции нейроэпителиальных клеток во время нейруляции проводили внутриклеточное маркирование отдельных нейробластов при помощи проционовых красителей RS и B2BS. После формирования нервной трубки и начала дифференцировки нейронов клетки, содержащие краситель, выявляли методом флуоресцентной микроскопии. В обнаруженные клетки при помощи микроэлектрода ионофоретически вводили второй краситель – люциферовый желтый СН. Он заполнял тела и отростки нейронов, что позволило выявить паттерн связей головного мозга. Установлено, что первичные связи формируются между клетками, происходящими из нескольких клонов, которые разобщаются за счет интеркаляции эпидермального и гиподермального слоев нейроэктодермы, пролиферации и миграции нейробластов.

*Ключевые слова:* нейробласты, миграция клеток, формирование паттерна, развитие мозга, нейронные связи

Экспериментальные исследования эмбрионального развития нервной системы в настоящее время активно проводятся на моделях, хорошо изученных как в морфологическом, так и в генетическом плане. Среди них наиболее удобны зародыши амфибий, которые обладают крупными клетками и независимым от родителей развитием [5]. В эмбриональном развитии бесхвостых амфибий проходящих метаморфоз, есть несколько особенностей, которые стали причиной проведения данной работы. Во время личиночного развития у лягушек происходит формирование временной нервной системы, обеспечивающей выживание и рост особи [4, 7]. Эта нервная система нужна только в эмбриональный период и необходима для обслуживания органов, которые отсутствуют у взрослых животных. Такие временные адаптации носят приспособительный или ценогенетический характер, а их функционирование связано лишь с эмбриональным и личиночным развитием. Эти эмбриональные приспособления нервной системы исчезают после прохождения метаморфоза.

Следовательно, во время индивидуального развития у метаморфизирующих амфибий существует две конструкции нервной системы. Первой появляется эмбриональная, которая нужна для выполнения временных личиночных функций. Пока временная эмбриональная

нервная система выполняет свои задачи, развивается «взрослая» нервная система для функционирования после метаморфоза. Это условное разделение общей нервной системы имеет большое биологическое значение, поскольку нейроны, принимающие участие в ценогенетических адаптациях, чаще всего просто погибают [8, 10]. Примером могут служить парные маутнеровские нейроны заднего мозга личинок амфибий. Они являются двигательными нейронами и управляют всем движением хвоста. Во время метаморфоза хвост исчезает, а маутнеровские нейроны фагоцитируются своим окружением.

По этой причине ранее была высказана гипотеза об общем происхождении всего пула нейронов, выполняющих ценогенетические функции [1, 2]. Предполагалось, что, происходя из общего клона клеток, эти нейробласты мигрируют, первыми выходят в дифференцировку, а затем между собой устанавливают первичный паттерн нервных связей [4, 10]. Для проверки этой гипотезы и выполнена настоящая работа. На первом этапе было проведено маркирование нейробластов нервной пластинки и отслеживание их миграций. На втором этапе маркированные нейроны выявляли в нервной трубке и вторично маркировали для выявления паттерна первичных нервных связей. Если связи будут формироваться между нейробласта-

ми, мечеными на стадии нервной пластинки, то гипотеза общего клонального источника верна [12, 13]. При формировании первичного паттерна нервных связей как между мечеными, так и немечеными нейронами сделанное предположение подвергнется сомнению.

**Материалы и методы**

Работа выполнена на 129 эмбрионах шпорцевой лягушки (*Xenopus laevis*), полученных в условиях лабораторного разведения. В экспериментах использовали зародыши от стадии нейруляции до начала активного питания. Для исследования миграции нейроэпителиальных клеток применяли маркирование проционовыми красителями RS и B2BS. Внутриклеточное введение красителей проводили при помощи микроманипулятора Leitz (Германия) и электродов, подсоединенных к микроинъекционной системе. Маркирование осуществляли на стадии ранней нейрулы, когда большие размеры клеток позволяли в 45% случаев проводить удачные инъекции проционовых красителей. Меченые нейробласты отслеживали во время развития на поверхности нейруляционной пластинки до стадии 19–20 [3, 9] при помощи флуоресцентных микроскопов Leitz II Pol BK (Германия) и «Люам И-3» (Россия). Относительно безопасного для клеток объема

красителя иногда хватало для обнаружения меченых потомков нейробластов после 4–6 делений. Следы флуоресценции обнаруживали перед вылуплением зародышей из икринок в вышедших из пролиферации и мигрировавших к поверхности мозга нейронах. На стадиях 32–38 [3] после обнаружения меченой клетки в нее вводили микроэлектрод и ионофоретически подавали краситель. Для заполнения тел и отростков клеток использовали люциферовый желтый СН. Заполнение нейронов красителем продолжали от 2 до 9 часов. К сожалению, заполнить красителем отдельный нейрон удавалось только в 30% операций. Как правило, краситель поступал в несколько отростков и распространялся по ним. После инъекции зародыши переживали от 2 до 3 суток, а затем подвергались фиксации в 10% нейтральном формальдегиде. Введение люциферового желтого проводили в разные отделы дифференцирующегося головного мозга, как показано на схеме (рис. 1 В), где были обнаружены маркированные во время нейруляции клетки (рис. 1 Г, рис. 2). Они были выявлены в переднем, среднем и заднем мозге. На схеме (рис. 3) показаны области и число введений, которое соответствует числу синих меток. Фиксированные в 10% формальдегиде зародыши пропитывали 30% сахарозой и получали криостатные срезы. Сагит-

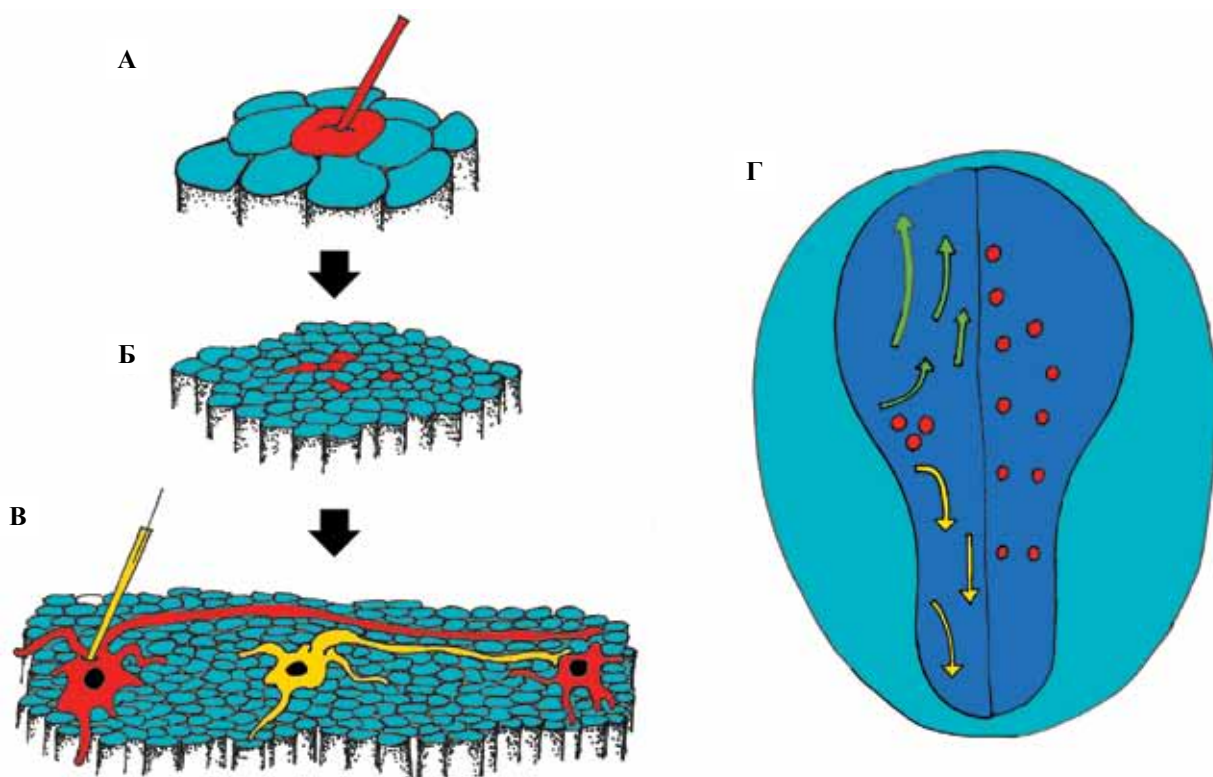


Рис. 1. Схема проведенных экспериментов и основные направления перемещения нейробластов на стадии нервной пластинки.

А – введение проционовых красителей на стадии нервной пластинки;

Б – перемешивание и миграция нейроэпителиальных клеток после интеркаляции; В – введение люциферового желтого СН в дифференцирующиеся нейроны на поверхности нервной трубки и ионофоретическое заполнение красителем их отростков;

Г – направление перемещения меченых клеток во время нейруляции

тальные срезы толщиной 20–25 мкм заключали в глицерин или полиэтиленгликоль с молекулярной массой 4000–6000. Маркированные нейробласты и нейроны исследовали при помощи флуоресцентного микроскопа в сочетании с использованием методов интерференции в поляризованном свете, фазового контраста и темного поля.

### Результаты

В случае удачного введения проционового маркера на стадии нервной трубки были хорошо заметны

группы и одиночные клетки, содержащие краситель (рис. 2). Необходимо отметить, что нейроэпителий зародышей шпорцевой лягушки двуслойен. Маркированию подвергались только клетки эпидермального слоя, лежащего на поверхности нервной пластинки. Непосредственно после нейруляции происходит встречное вытягивание отростков нейробластов эпидермального и гиподермального слоев нервной пластинки. Результатом встречной интеркаляции становится монослойный эпителий, характерный для большинства позвоночных. Меченые клетки закрепляются как на базальной, так

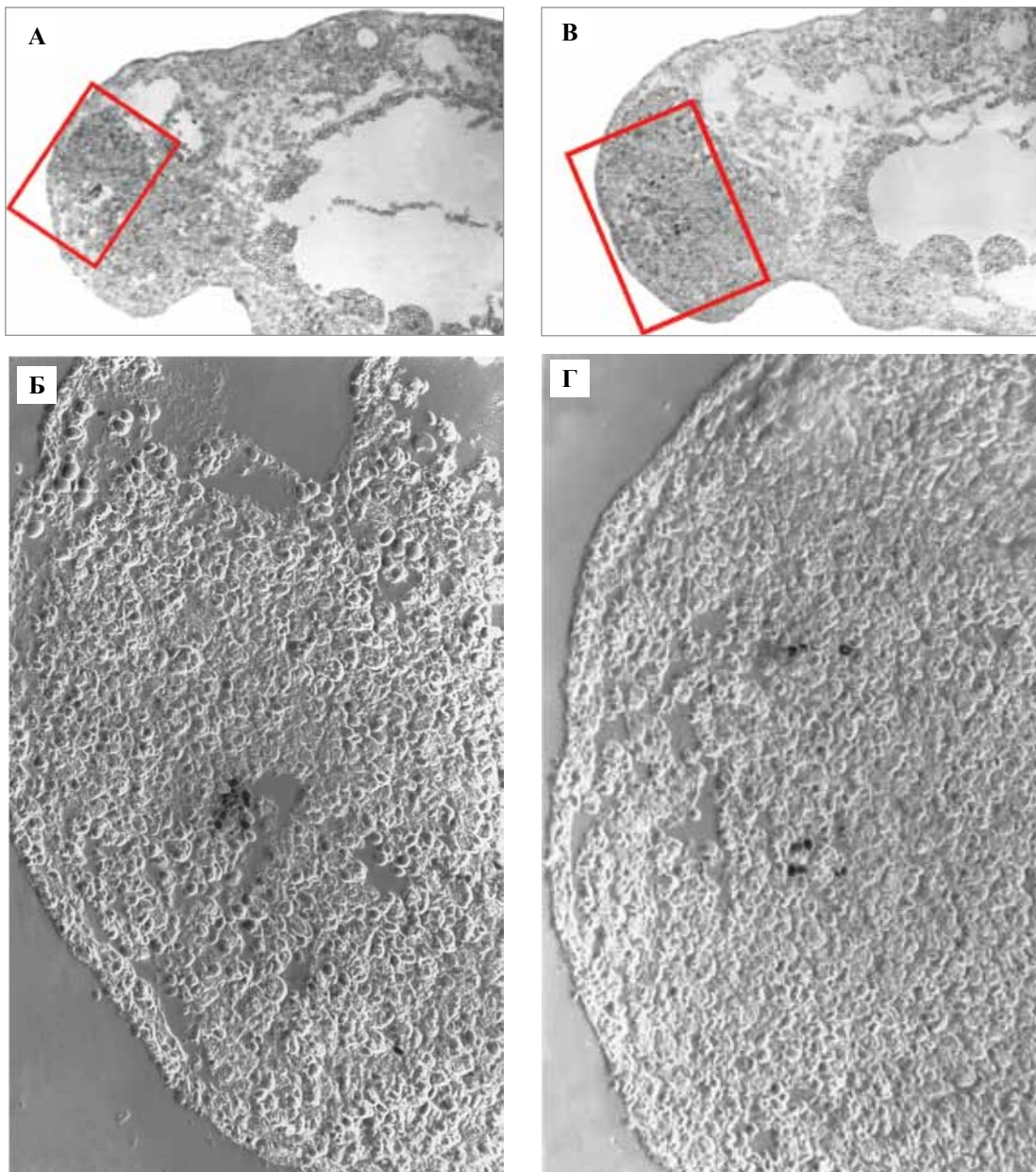


Рис. 2. Микрофотографии сагиттальных срезов нервной трубки, содержащих маркированные клетки в стенке мозга, среди неокрашенных нейробластов.

А, Б – компактная группа меченых клеток; В, Г – разошедшиеся потомки меченых клеток. На срезах, сделанных при малом увеличении, красными прямоугольниками показаны увеличенные участки на фотографиях Б и Г.

Неокрашенные криостатные срезы, заключенные в полиэтиленгликоль, фазовый контраст.

А – стадия 25, объектив  $\times 10$ ; Б – стадия 25, объектив  $\times 40$ ; В – стадия 32, объектив  $\times 10$ ; Г – стадия 32, объектив  $\times 40$



и на апикальной поверхности нервной трубки. Результатом интеркаляции становится перемешивание потомков меченых и немеченых нейробластов. Этот процесс усиливался пролиферацией нейробластов. При каждом пролиферативном цикле нейробласты утрачивают связь с наружной мембраной нервной трубки и проходят телофазу в прижелудочковой зоне. Затем апикальный отросток нейробласта возвращается по мембранам соседних клеток к апикальной мембране. Возвращение апикального отростка всегда происходит по новым путям, поскольку соседние клетки пролиферируют и принимают участие в активном изменении формы эмбрионального мозга. Следовательно, в миграционные процессы разделения потомков меченых клеток включена как постнейруляционная интеркаляция двуслойного нейроэпителия, так и процессы пролиферации.

Исследование путей движения маркированных нейробластов показало, что основным направлением перемещения клеток в период нейруляции является росто-каудальная миграция (рис. 1). Она начиналась от латеральных краев средней части нервной пластинки и продолжалась одновременно в ростральном и каудальном направлениях. К концу нейруляции каудальные миграции нейроэпителиальных клеток останавливались. Ростральные движения нейробластов становились все более локальными и к началу первичной дифференцировки полностью прекращались.

После замыкания нервной трубки и формирования эктодермы меченые нейроэпителиальные клетки выявлять не удавалось. В течение 20–28 часов на латеральной поверхности нервной трубки появляются отростки нейробластов, которые вышли из пролиферации. Эти клетки начинают дифференцироваться и образуют активные отростки. Они совершают поисковые движения, двигаясь по максимально гетерогенному субстрату из апикальных поверхностей рапировидных нейробластов (рис. 1 В). В этот период устанавливается первичный паттерн связей между дифференцирующимися нейронами. К моменту вылупления зародышей из икринок первичная система нервных связей достаточно развита для обеспечения минимальных активных движений и реакции на резкие механические колебания воды.

Для выявления первичного паттерна нервных связей мы проводили вторичное маркирование нейронов, сохранивших первичную метку, стильбеновыми красителями (рис. 1 А–В). Вторичное маркирование показало существование длинных нервных связей, объединяющих наиболее удаленные отделы головного мозга (рис. 4). Отдельные нейроны были обнаружены в переднем мозге после введения люциферового желтого в медиальной и латеральной зонах заднего мозга. При этом введение красителя в двигательные (медиальные) области правой области заднего мозга приводило к выявлению нейронов в правом (контралатеральном) полушарии переднего мозга. Инъекции красителя в дорсолатеральные (сенсорные) зоны левой половины

заднего мозга позволяло определить связи в ипсилатеральном полушарии переднего мозга (рис. 3 А, Б). Отдельные нейроны выявляли в структурах медиального плаща (*medial pallium*) переднего мозга, который является эволюционным предшественником гиппокампа (*hippocampus primordialis*). Кроме того, метки были найдены в септуме (*lateral septal nucleus*) и даже в молекулярном слое обонятельной луковицы (*molecular layer bulbous olfactorius*) (рис. 4 А, Б).

Полученные данные проверены в эксперименте по введению люциферового желтого в правое полушарие переднего мозга (рис. 3 Г). Оказалось, что медиальный плащ связан как с сенсорными, так и с двигательными отделами заднего мозга. Особый интерес представляет выявленная в двух случаях флуоресценция крупных маутнеровских нейронов продолговатого мозга (рис. 4 Е). Эти нейроны осуществляют управление мускулатурой хвоста и исчезают в конце метаморфоза шпорцевой лягушки. Введение красителя в передний мозг показало раннее формирование межполушарных связей через переднюю комиссуру (*commissura anterior*) (рис. 3 Г). При анализе последствий введения маркера в передний мозг выявлены связи медиального плаща с крышей среднего мозга. Обнаруженные нейроны были расположены в слоях крыши среднего мозга (*stratum griseum centrale*) (рис. 3 Г, 4 В).

Люциферовый желтый, введенный в крышу среднего мозга, не позволил выявить связи с полушариями переднего мозга (рис. 3 В). Меченые нейроны были преимущественно обнаружены в противоположном полушарии крыши среднего мозга, что говорит о наличии развитых связей через комиссуру крыши среднего мозга (*commissura tecti*). Отдельные нейроны выявлены в заднем межжолковом ядре промежуточного мозга (*nucleus entopeduncularis posterior*) и двигательных центрах заднего мозга (*nucleus reticularis medius*) (рис. 3 В, 4 Д). Существование установленных связей удалось подтвердить введением красителя в моторные центры заднего мозга. После этих операций нейроны были выявлены в центральном сером веществе крыши среднего мозга и крупных клетках базальных ядер (*nucleus magnocellularis torus semicircularis*) (рис. 4 Г).

## Обсуждение

В экспериментах по маркированию нейробластов на стадии нейруляции нами были выявлены их росто-каудальные перемещения. От средней линии нервной пластинки миграция нейробластов происходила как в ростральном, так и в каудальном направлениях (рис. 1 Г). Эти данные совпадают с результатами экспериментов по нейруляционным миграциям, полученным другими методами на хвостатых и бесхвостых амфибиях [6, 11]. Основным отличием нашей работы является доказательство существования росто-каудальных миграций при наличии двуслойного нейроэпителия. Существенным результатом можно считать выявленную расходимость потомков меченых клеток

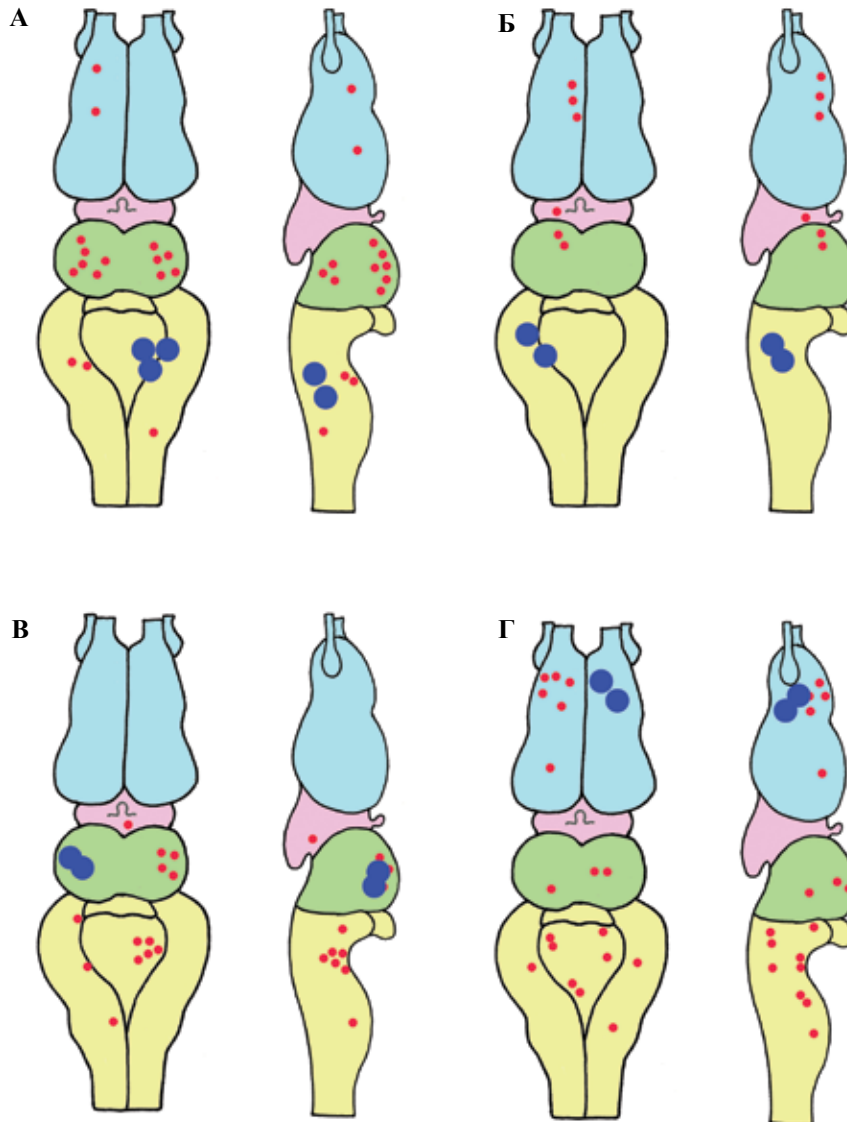
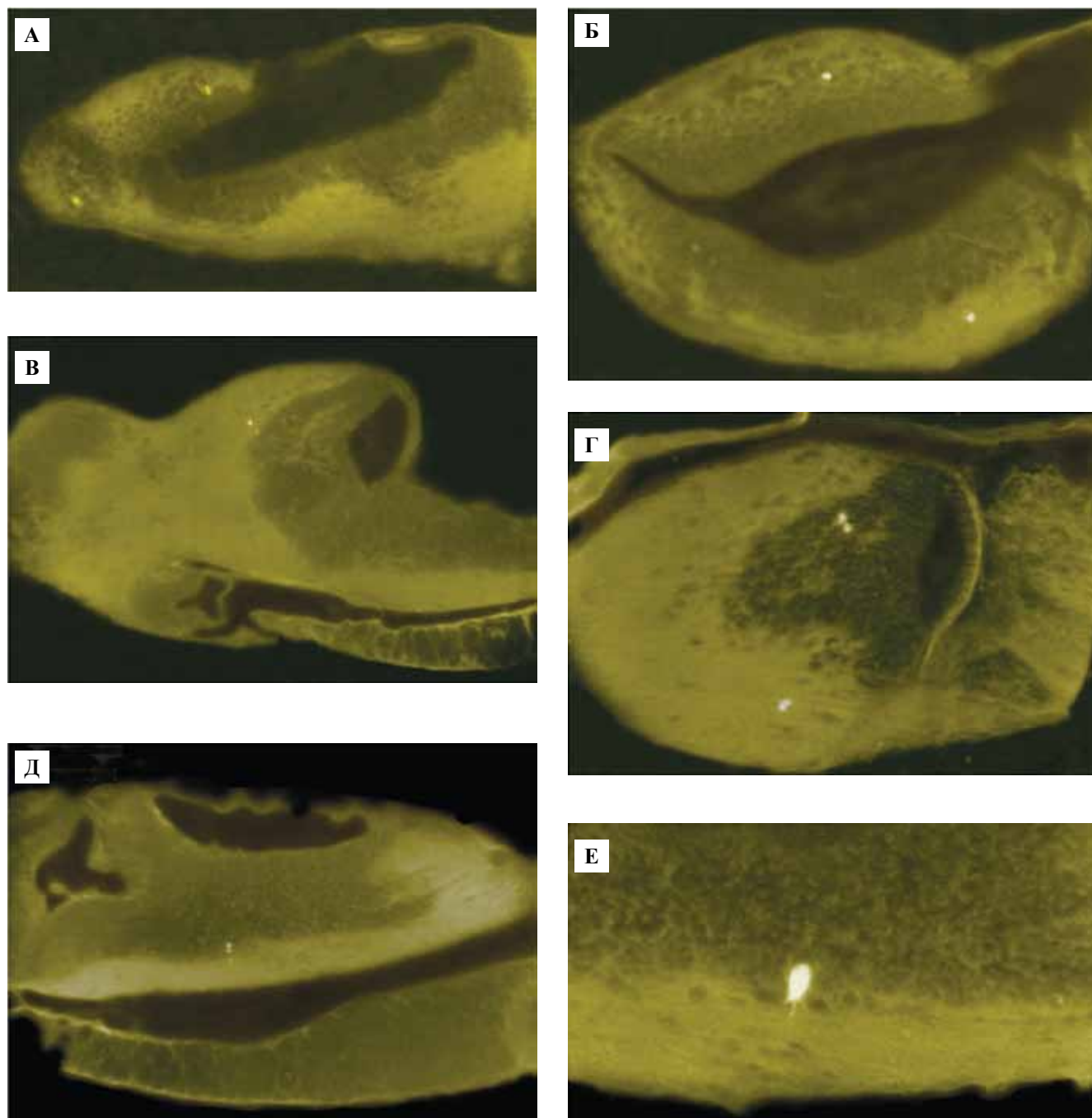


Рис. 3. Схема головного мозга личинки шпорцевой лягушки с местами введения люциферового желтого и локализация меченых нейронов. Введение красителя в задний мозг (А, Б), средний мозг (В) и передний мозг (Г). Синими точками обозначены зоны введения красителя, красными – места выявления меченых нейронов. Голубым обозначен передний мозг, розовым – промежуточный, зеленым – средний, желтым – задний и продолговатый мозг

от общей анцестральной клетки-предшественника. Это доказывает возможность перемешивания потомков одного клона клеток на стадии нейруляции и нервной трубки. В этом отношении полученные результаты подтверждают данные о 60% перемешивании потомков отдельных бластомеров, меченных на клеточных стадиях 256, 512 и 1024 развития шпорцевой лягушки [7–10].

Исследование ранних эмбриональных связей в мозге зародышей шпорцевой лягушки показало, что первичный паттерн нервных связей не зависит от морфогенетических миграций нейробластов. Аксоны нейронов формируются как между потомками нейронов из одной клональной группы, так и клетками из других областей нервной пластинки. Следовательно, процессы rostro-каудальной миграции и перемешивания потомков

общей анцестральной нейроэпителиальной клетки не предполагают установление жестко детерминированных связей. Это означает, что первичный паттерн нервных связей образуется случайным образом между нейронами, происходящими от клеток из различных первичных клонов. Основным отличием первичного паттерна связей является его направленность на выполнение временных эмбриональных функций [9]. Так, большая часть волокон, идущих от обонятельных, зрительных, сенсомоторных центров и октаволатеральной системы, заканчивается в двигательных отделах нервной системы. Таким способом происходит простейшее обеспечение системной адаптации организма, которая построена на движении личинок в водной среде. По сути дела, основным исполнительным



*Рис. 4.* Микрофотографии сагиттальных срезов головного мозга личинок шпорцевой лягушки с нейронами, заполненными люциферовым желтым СН. В переднем мозге нейроны выявлены в структурах медиального плаща (medial pallium), в септуме (lateral septal nucleus) и молекулярном слое обонятельной луковицы (molecular layer bulbus olfactorius) (А, Б).

В среднем мозге нейроны выявлены в крыше (stratum griseum centrale) и крупных клетках базальных ядер (nucleus magnocellularis torus semicircularis) (В, Г).

В заднем мозге краситель обнаружен в крупных маутнеровских нейронах и двигательных медиальных ядрах (nucleus reticularis medius) (Д, Е).

А – личинка на стадии 41, объектив  $\times 10$ ; Б – личинка на стадии 40, объектив  $\times 20$ ;

В – личинка на стадии 39, объектив  $\times 10$ ; Г – личинка на стадии 42, объектив  $\times 20$ ;

Д – личинка на стадии 41, объектив  $\times 10$ ; Е – личинка на стадии 42, объектив  $\times 40$

механизмом, детерминирующим поведение личинок, являются маутнеровские нейроны. Они обеспечивают реакции избегания и направленную миграцию по пищевым, температурным и световым градиентам. Следовательно, вместе с гибелью маутнеровских нейронов вся временная адаптивная нервная сеть распадается. Нейроны сенсорных центров переключают свои связи на «взрослые» двигательные центры.

### Заключение

В нашей работе подтверждены данные о rostro-caudальной миграции нейробластов на стадии нервной пластинки. Это происходит в двуслойном нейроэпителии и продолжается после интеркаляции нейробластов на стадии нервной трубки. В перемешивании потомков одиночных нейробластов большую роль играют пролиферация и движения нейроэпителия, связанные с формообразованием. Анализ результатов первичных нервных связей нейронов показал, что гипотеза клональной детерминации цитогенетических связей неверна. Паттерн первичных нервных связей нервной трубки может возникать между любыми дифференцирующимися нейронами. Следовательно, развитие и первичная дифференцировка в данном случае носят регуляционный, а не детерминационный характер.

*Работа выполнена в рамках государственного задания по теме «Молекулярно-гистогенетические нарушения дифференцировки нервной и эндокринной систем в эмбриональном развитии и в патогенезе социальнозначимых заболеваний», номер госрегистрации АААА-А17-117013050051-6.*

### Литература/References

1. Детлаф Т.А., Руднева Т.Б. Шпорцевая лягушка *Xenopus laevis* Daudin. В кн.: Объекты биологии развития / Под ред. Б.Л. Астаурова, Т.А. Детлаф. М.: Наука, 1975, С. 392–441 [Detlaf T.A., Rudneva T.B. Clawed frog *Xenopus laevis*. V kn.: Ob'yekty biologii razvitiya / Pod red. B.L. Astaurova, T.A. Detlaf. M.: Nauka, 1975. S. 392–441 (In Russ.)].
2. Савельев С.В. Формообразование мозга позвоночных. М.: Издательство МГУ, 1993. 143 с. [Saveliev S.V. Morphogenesis of vertebrates brain. M.: Moscow State University Publishing House, 1993. 143 s. (in Russ.)].
3. Савельев С.В. Эмбриональная патология нервной системы. М.: ВЕДИ, 2007. 215 с. [Saveliev S.V. Embryonic pathology of nervous system. M.: VEDI, 2007. 215 s. (in Russ.)].
4. Bandin S., Morona R., Gonzalez A. Prepatterning and patterning of the thalamus along embryonic development of *Xenopus laevis* // Front. Neuroanat. 2015;9:107. doi: 10.3389/fnana.2015.00107
5. Borodinsky L.N. *Xenopus laevis* as model organism for the study of spinal cord formation, development, function and regeneration // Front. Neural Circuits. 2017;11:90. doi:10.3389/fncir.2017.00090.
6. Carpenter E. The head pattern in *Amblystoma* studied by vital staining and transplantation methods // J. Exper. Zool. 1937; 75(1):103–29.
7. D'Amico L.A., Boujard D., Coumilleau P. Proliferation, migration and differentiation in juvenile and adult *Xenopus laevis* brains // Brain Res. 2011;1405:31–48. doi: 10.1016/j.brainres.2011.06.032
8. Jacobson M., Hirose G. Clonal organization of the central nervous system of the frog. II. Clones stemming from individual blastomeres of the 32- and 64-cell stages // J. Neurosci. 1981;1(3):271–84.
9. Jacobson M., Klein S.L. Analysis of clonal restriction of mingling in *Xenopus* // Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B. 1985;312: 57–65.
10. Hirose G., Jacobson M. Clonal organization of the central nervous system of the frog. I. Clones stemming from individual blastomeres of the 16-cell and earlier stages // Dev. Biol. 1979;71:191–202.
11. Moody S.A. Fates of the blastomeres of the 32-cell stage *Xenopus* embryo // Dev. Biol. 1987;122:300–19.
12. Moreno N., Gonzales A. Pattern of neurogenesis and identification of neuronal progenitor subtypes during pallial development in *Xenopus laevis* // Front. Neuroanat. 2017. doi.org/10.3389/fnana.2017.00024.
13. Shepard P., Jacobson M. Clonal restriction boundaries in *Xenopus* embryos shown with two intracellular lineage tracers // Science. 1987;236(4799): 851–4.

## NEUROBLASTS MIGRATION AND PATTERN FORMATION DURING DEVELOPMENT OF THE *XENOPUS LAEVIS*

*S.V. Saveliev, N.V. Besova, E.S. Savelieva, V.I. Gulimova*

Research Institute of Human Morphology, Moscow

The migration of neuroblasts at the stage of neurulation and the formation of a primary pattern of neural connections of the brain in a spur frog (*Xenopus laevis*) were studied. In the experiments, 129 embryos from the stage of the formation of the neural plate before the start of active feeding of the hatched larvae were used. To study the migration of neuroepithelial cells during neurulation, intracellular labeling of individual neuroblasts was performed using procyon dyes RS and B2BS. After the formation of the neural tube and the start of differentiation of neurons, cells containing the dye were detected using a fluorescent microscope. Using a microelectrode, a second dye, luciferous yellow CH, was introduced into the detected cells using a microelectrode. It filled the bodies and processes of neurons, which made it possible to reveal the pattern

of connections of the brain. It is established that primary bonds are formed between cells originating from a different clones, which disintegrates due to the intercalation of the epidermal and hypodermal layers of the neuroectoderm, proliferation and migration of neuroblasts.

*Key words:* neuroblasts, cell migration, pattern formation, brain development, neuronal connections

### **Информация об авторах**

Савельев Сергей Вячеславович – доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией развития нервной системы НИИ морфологии человека.

Адрес: 117418, Москва, ул. Цюрупы, д. 3. Телефон 8 985 922 2938. E-mail: braincase@yandex.ru

Бесова Надежда Васильевна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории развития нервной системы НИИ морфологии человека.

Адрес: 117418, Москва, ул. Цюрупы, д. 3.

Савельева Екатерина Сергеевна – кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории развития нервной системы НИИ морфологии человека.

Адрес: 117418, Москва, ул. Цюрупы, д. 3.

Гулимова Виктория Игоревна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории развития нервной системы НИИ морфологии человека.

Адрес: 117418, Москва, ул. Цюрупы, д. 3.

*Материал поступил в редакцию 13 февраля 2019 года*