

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Бредов Денис Владимирович

**Влияние механической силы на клеточные перегруппировки в
гастрюляции амфибии *Xenopus laevis***

1.5.23 – Биология развития, эмбриология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва – 2022

Работа выполнена на кафедре эмбриологии биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова

- Научный руководитель** – *Краус Юлия Александровна, доктор биологических наук*
- Официальные оппоненты** – *Бурлаков Александр Борисович, д.б.н., профессор, в.н.с. кафедры ихтиологии биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»*
- Исаева Валерия Васильевна, д.б.н., профессор, в.н.с. лаборатории экологии и морфологии морских беспозвоночных Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова Российской Академии Наук»*
- Мартынова Наталья Юрьевна, к.б.н., с.н.с. лаборатории молекулярных основ эмбриогенеза Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук»*

Защита диссертации состоится «13» декабря 2022 г. в 15:30 часов на заседании диссертационного совета МГУ.015.9 Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова по адресу: 119234, Москва, ул. Ленинские Горы, 1, стр. 12, биологический факультет, ауд.389.

E-mail: dis_kalsov@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций Научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на сайте ИАС «ИСТИНА»: <http://istina.msu.ru/dissertations/503457677/>

Автореферат разослан «___» _____ 2022 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Е.Н. Калистратова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность и степень разработанности темы исследования.

Морфогенез – изменение формы эмбриона или его частей в ходе развития. В основе морфогенетических процессов лежат точно скоординированные в пространстве и времени движения клеток. Наблюдаемые при морфогенетических процессах движения клеток могут быть сведены к нескольким универсальным типам [Solnica-Krezel, Sepich, 2012], для каждого из которых подробно изучены механизмы их регуляции. Среди регуляторных механизмов наиболее значимую роль играют градиенты сигнальных факторов [Damm, Winklbauer, 2011], а также физическое состояние межклеточного матрикса [Rozario и др., 2009].

Однако в основе деформации любого физического тела, в том числе и биологических тканей, лежит механическая сила [Davidson, 2011; Murray, 2003]. Поэтому, чтобы в полной мере ответить на вопрос, почему формобразование каждой из структур эмбриона протекает строго определенным образом, необходимо изучить распределение механических сил (называемое также полем механических напряжений) в формирующейся структуре. Было экспериментально подтверждено, что нормальное протекание морфогенетических процессов сопряжено с формированием специфического поля механических напряжений внутри эмбриональной ткани [Belousov, Dorfman, Cherdantzev, 1975; Streichan и др., 2018]. Изменение этого поля может приводить к нарушениям развития [Evstifeeva, Kremnyov, Belousov, 2010].

Так как механические силы способны быстро распространяться в ткани, они потенциально могут выступать одним из факторов, регулирующих внутриклеточные процессы. Накопленные данные демонстрируют, что механическая сила действительно способна влиять на различные процессы, начиная с экспрессии генов заканчивая частотой делений клеток [Nestor-Bergmann и др., 2019]. В том числе, механические силы могут влиять на подвижность клеток внутри ткани [Bjerke и др., 2014; Weber, Bjerke, DeSimone, 2012] и перестройку клеточных контактов [Yu, Fernandez-Gonzalez, 2016]. При этом клетки внутри ткани сохраняют общее направление миграции только при наличии между ними механического контакта [Dumortier и др., 2012; Sonavane и др., 2017].

Однако до сих пор связь между движениями клеток и механическими напряжениями в ткани остается практически неизученной. Число экспериментальных работ в этой области очень невелико. Таким образом, актуальность темы данного исследования обусловлена необходимостью восполнить пробел в наших знаниях о фундаментальных закономерностях регуляции морфогенетических процессов.

Цель работы: охарактеризовать взаимосвязь между механической силой и клеточными перегруппировками в тканях гаструлы амфибии *Xenopus laevis*.

Задачи исследования:

1. Сравнить частоту перегруппировок клеток в регионах зафиксированной интактной гастролы *X. laevis*, качественно различающихся по величине механических напряжений.
2. Используя цейтраферную съёмку *in vivo* описать распределение механических напряжений в супрбластопоральной области с помощью анализа микродеформаций ткани.
3. Используя цейтраферную съёмку *in vivo*, охарактеризовать динамику перегруппировок клеток в супрбластопоральной области и её связь с микродеформациями ткани.
4. Разработать методику контролируемого растяжения эмбриональной ткани в физиологическом диапазоне деформаций.
5. Провести эксперименты по контролируемому растяжению эксплантатов эмбриональной ткани и установить взаимосвязь между механической силой и перегруппировкой клеток в растянутых тканях.

Объект и предмет исследования

Объектом исследования диссертационной работы являлись эмбрионы *Xenopus laevis* на стадиях ранней и средней гастролы. Предметом исследования являлось изучение влияния механической силы на перегруппировку клеток эмбриональной эпизктодермы.

Научная новизна работы

Ключевой научной идеей работы является гипотеза о том, что механическая сила, действующая на эмбриональную ткань в ходе морфогенетических процессов, регулирует частоту перегруппировки клеток. Эти перегруппировки позволяют компенсировать избыточную деформацию, возникающую в эмбриональной ткани под действием механической силы. В рамках диссертационного исследования впервые продемонстрировано, что в тканях, характеризующихся большими значениями механических напряжений, наблюдается большее число клеток, вовлечённых в перегруппировки.

В рамках работы были проведены как наблюдения *in vivo*, так и эксперименты с применением установки для контролируемой деформации эмбриональных тканей. В диссертационном исследовании впервые показано существование взаимосвязи между механическими силами физиологической амплитуды, интенсивностью перегруппировок клеток эмбриональной ткани и межиндивидуальной изменчивостью частоты клеточных перегруппировок. Работа представляет основу для дальнейшего экспериментального исследования молекулярных и клеточных механизмов ответа ткани на действие механических сил.

Теоретическая и практическая значимость работы

Диссертационная работа посвящена изучению одной из

фундаментальной закономерности развития - зависимости перегруппировки клеток эмбрионального эпителия от действия механических сил. Полученные результаты расширяют наше понимание роли механических сил в регуляции морфогенетических процессов. Эти результаты могут стать основой для дальнейшего углубленного изучения молекулярных механизмов, регулирующих перегруппировку клеток в ответ на действие механической силы.

Практически значимым результатом работы является создание установки для контролируемого одноосевого растяжения эмбриональных тканей. Эта установка может быть использована в биомедицинских исследованиях, посвященных механозависимой дифференцировке клеток.

Методология и методы исследования

Проведенные в ходе работы исследования основываются на современных методологических подходах. Применимость и корректность использованных методов обоснованы анализом литературных данных о степени разработанности проблемы, постановкой цели и задач исследования.

В диссертационной работе применены методы молекулярной биологии и экспериментальной эмбриологии. Несомненным преимуществом также является использование разработанного в ходе выполнения работы метода контролируемого автоматизированного растяжения эмбриональной ткани для исследования роли механических сил в регуляции перегруппировок клеток. Анализ полученных данных проводился с помощью релевантных методов статистической обработки данных. Полностью методология и методы, используемые при выполнении данной работы, отражены в разделе «Материалы и методы».

Достоверность результатов

Результаты диссертационной работы обладают высокой степенью достоверности. Для достижения этого автором работы был проведён глубокий анализ научной отечественной и зарубежной литературы, позволивший сформировать первоначальные гипотезы. Для проверки гипотез были проведены серии независимых научных экспериментов, включающие в себя необходимое число экспериментальных точек и повторностей, а также необходимое число экспериментальных животных. Полученные данные были обработаны с помощью статистического анализа с использованием адекватных критериев, что позволило получить статистически значимые результаты.

Апробация работы

Основные результаты работы были представлены на конференции «Морфогенез в индивидуальном и историческом развитии: онтогенез и формирование биологического разнообразия», Россия, 2017, VI съезде биофизиков России, Россия, 2019, конференции «Contemporary

morphogenesis», England, 2019, XVIII конференции-школе с международным участием «АКТУАЛЬНЫЕ ПРОБЛЕМЫ БИОЛОГИИ РАЗВИТИЯ», Россия, 2019, а также XIV Всероссийской (с международным участием) конференции «БИОМЕХАНИКА – 2020», Россия, 2020.

Публикации

По материалам работы опубликовано 3 печатных работы, все 3 статьи опубликованы в рецензируемых научных изданиях, индексируемых Scopus и RSCI. На основании полученных результатов опубликован патент Российской Федерации (патентная заявка № 2019134465 от 28.10.2019, дата регистрации 17.06.2020).

Личный вклад автора в проведение исследования

Автору диссертационного исследования принадлежит основная роль в формулировке целей и задач исследования, подготовке и проведении экспериментов, статистической обработке данных, подготовке тезисов, публикаций и патента по теме исследования.

Положения, выносимые на защиту

1. Частота клеточных перегруппировок зависит от величины механических напряжений в эмбриональной ткани.
2. Распределение механических напряжений в эмбриональной ткани отражает активность морфогенетических процессов, связанных с коллективными движениями клеток.
3. Воздействие механической силы в физиологическом диапазоне значений приводит к снижению уровня изменчивости частоты клеточных перегруппировок в эмбриональной ткани.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы

Получение эмбрионов. Эмбрионы *X. laevis* получали и культивировали *in vitro* согласно стандартным протоколам [Sive, Grainger, Harland, 2000].

Инъекция РНК. Для маркирования клеточных границ осуществляли инъекцию мРНК мембранного (GAP43-GFP) и ядерного (H2B-mCherry) маркёров в эмбрионы на стадиях от 2х до 4х бластомеров.

Микрохирургические операции. В ходе микрохирургических операций проводили изоляцию фрагментов эмбриональной ткани для экспериментов по искусственной деформации.

Окрашивание на F-актин. Эксплантаты и интактные зародыши различных сроков фиксировались в растворе 3,7% формальдегида, 30 мин промывались PBS и PBS-T, помещались на 45 мин в раствор Rhodamine-phalloidin (0,005 мг/мл в PBS-T).

Искусственная деформация эксплантатов. Для искусственной

деформации эксплантаты прикрепляли к эластичному субстрату с помощью адгезионного покрытия из белков внеклеточного матрикса, после чего растягивали субстрат. Адгезионное покрытие обеспечивало передачу растяжения от субстрата к эксплантату. Растяжение субстрата осуществляли с помощью разработанной нами установки для высокоточного одноосевого растяжения эластичных субстратов для культивирования клеток и эмбриональных тканей (патент RU2723726С1, изготовлено ООО «Троицкий инженерный центр», Россия) (Рис. 1).

В качестве эластичного субстрата использовали инкубационные камеры (STREX Inc., США) с амплитудой растяжения до 20%, и камеры, изготовленные в лаборатории. Для изготовления камер использовали сверхтонкую эластичную плёнку Gel-Pak PF-40-X0. Фрагмент плёнки нужного размера промывали спиртом. После полного высыхания на плёнку устанавливали

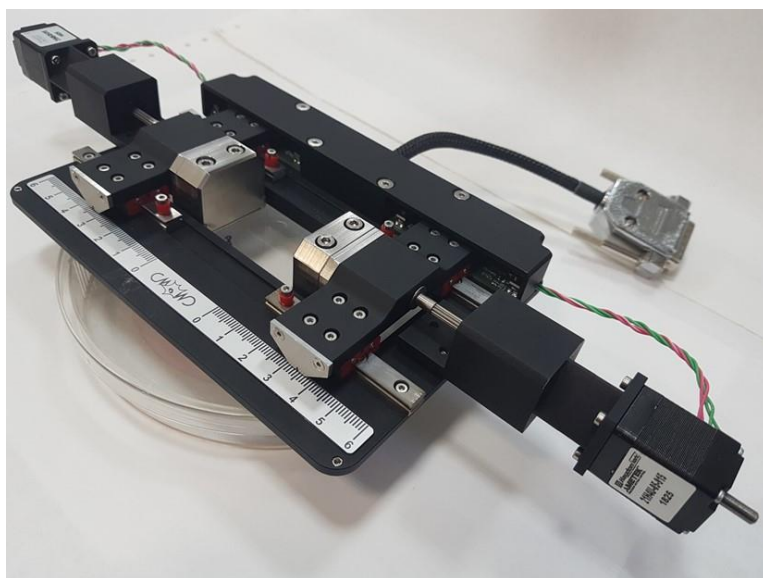


Рис. 1 Общий вид установки для высокоточного одноосевого растяжения эластичных клеточных подложек

бортики из PDMS и герметизировали соединение с помощью силиконовой смазки (Dow Corning High Vacuum Grease). Чтобы обеспечить адгезию эксплантатов ко дну камер, на него наносили покрытие из фибронектина человека (ООО «Имтек», Россия). Для нанесения покрытия камеры облучали УФ под на расстоянии 3 см от УФ-лампы в течение 45 минут, чтобы сделать материал камеры более гидрофильным и увеличить его сродство к фибронектину [Azioune и др., 2011; Goddard, Tarannum, Woolner, 2020]. После облучения внутрь камеры вносили 1 мл раствора фибронектина человека (1 мг/мл) и оставляли на ночь при +4°C [Davidson и др., 2002; Ramos, DeSimone, 1996]. На следующий день инкубационную камеру заполняли 1мл 1x MMR и монтировали её в установку для высокоточного одноосевого растяжения. Перед внесением эксплантатов, инкубационную камеру предрастягивали на 0,5 мм, чтобы минимизировать провисание дна.

После подготовки инкубационной камеры вырезали фрагменты из крыши бластоцеля эмбрионов на стадии 10-10 ½. Эксплантаты помещали в инкубационную камеру гипоэктодермой на субстрат, аккуратно прижимали покровным стеклом на силиконовых ножках, после чего инкубировали в течение двух часов для прикрепления к матриксу. Затем снимали покровное

стекло и монтировали установку для растяжения с закреплённой в ней инкубационной камерой на лазерный сканирующий конфокальный микроскоп Zeiss LSM-800. Процессом растяжения управляли с помощью ПО «SMC Program» (НПФ «Электропривод», Россия) ПК, через блок управления (ООО «Троицкий инженерный центр», Россия). Цейтраферную съёмку осуществляли в течение 1 часа.

Конфокальная микроскопия. Для регистрации движений клеток в эмбрионах *in vivo*, их помещали в агарозные лунки так, чтобы медиальный участок супрабластопоральной области каждого эмбриона оказался вблизи покровного стекла. Использовались лазерные сканирующие конфокальные микроскопы Olympus FV-10i (цейтраферная съёмка в течение часа с частотой 1 кадр/сек). Для обработки использовались данные по эмбрионам, доживших до стадии хвостовой почки. Для регистрации движений клеток в эксплантатах установку для растяжения с закреплённой в ней инкубационной камерой монтировали на предметный столик лазерного сканирующего конфокального микроскопа Zeiss LSM-800 и осуществляли растяжение.

Морфометрический анализ. Распознавание клеточных границ на кадрах цейтраферной съёмки осуществляли с помощью программного пакета EpiTools 2.1.6. [Heller и др., 2016]. Файлы с распознанными границами обрабатывали в программе ICY bioimaging platform 2.0.0.0, затем экспортировали полученные данные в файл Microsoft Excel 365. В работе использовали следующие морфометрические показатели:

- Смещение клетки - кратчайшее расстояние между геометрическим центром клетки на двух последовательных кадрах съёмки. Так временной промежуток между кадрами составляет 1 мин, рассчитанное перемещение, фактически, представляет собой среднюю скорость смещения клетки с размерностью мкм/мин;
- Угол α (принимает значения от 0° до 360°) между вектором смещения клеток и антерио-постериорной осью эмбриона (совпадает с осью 0° - 180° , где 0° соответствует постериорному полюсу, а 180° – антериорному);
- Параметра порядка $S = \langle \cos(\alpha) \rangle$, где α – угол между направлением смещения отдельной клетки и антеропостериорной осью эмбриона (α принимает значения от 0° до 360°), $\langle \rangle$ – усреднение по нескольким значениям. Использовался для оценки сонаправленности смещений клеток. Если траектория смещения и антеропостериорная ось параллельны и сонаправлены, угол между ними равен 0° , и S принимает значение равное $\cos(0^\circ) = 1$, если же они параллельны, но имеют противоположные направления, угол между ними равен 180° , а S принимает значение равное $\cos(180^\circ) = -1$ [Kemkemer и др., 2006; Reffay и др., 2011].
- Эксцентриситет $E = \sqrt{1 - \frac{b^2}{a^2}}$, где a – длина большой оси, b – длина малой оси; длины большой и малой осей вычислялись при аппроксимации формы

клетки эллипсом с помощью специального модуля для ICY bioimaging platfrom 2.0.0.0. Эксцентриситет использовался для оценки формы клеток. Его значение изменяется от 0 до 1, где значения, близкие к 0 соответствует круглым клеткам, а близкие к 1 – сильно вытянутым.

- Микродеформация – изменение расстояния между парой контактирующих клеток на двух последовательных кадрах съёмки. Для расчёта микродеформаций получали список контактирующих клеток с помощью специального модуля для ICY bioimaging platfrom 2.0.0.0, после чего используя координаты геометрических центров клеток, рассчитывали расстояние между контактирующими клетками с помощью библиотеки Pandas (Python 3.10.2).

Статистический анализ. Статистическую обработку данных осуществляли в программах Python 3.10.2, Microsoft Excel 365 и STATISTICA 10.0.

Результаты и обсуждение

*Исследование частоты перегруппировок клеток в регионах интактной гастролы *X. laevis*, качественно различающихся по величине механических напряжений.*

Один из способов перегруппировок клеток в ходе гастрюляции – образование т.н. клеточных розеток, которые являются промежуточным этапом пространственно ориентированных переупаковок клеток. Такие переупаковки могут имеют морфогенетическое значение, обеспечивая удлинение передне-задней оси эмбриона [Blankenship и др., 2006].

Таблица 1 Результаты статистического анализа плотности розеток в супрбластопоральной области и крыше бластоцеля.

U-критерий Манна-Уитни		F-тест для сравнения выборочных дисперсий		Дисперсионный анализ с повторными измерениями		
вычисл.	критич.	вычисл.	критич.	Пересечение (ошибка)	Регион (ошибка)	
1.0	53	4,7	2,38	29328,4 (1138,62)	4647,45 (435,54)	SS
				1 (19)	1 (19)	Число степ. свободы
				29328,4 (59,93)	4647,45 (22,92)	MS
				489,39	202,739	F
$p < < 0.005$	$p^* = 0.05$	$p = 0.0007$	$p^* = 0.05$	$p < < 0.005$ ($p^* = 0.05$)	$p < < 0.005$ ($p^* = 0.05$)	

Чтобы оценить, как переупаковки клеток через розетки соотносятся с картой механических напряжений в гастрюляции *X. laevis*, мы подсчитали плотность клеточных розеток в регионах, качественно различающихся по

величине механических напряжений. В соответствии с картами механических напряжений [Belousov и др., 1994; Belousov, Dorfman, Cherdantzev, 1975], мы выбрали супрабластопоральную область (Рис. 2А) как регион, который в нормальном развитии находится по действием выраженных механических напряжений, и крышу бластоцеля – как регион с низкими значениями напряжений. За клеточную розетку принимали группу апексов 5 и более схожих по размеру клеток, границы которых сходятся в точку контакта (Рис. 2 Б-Б’’).

Для исследования региональных различий в перегруппировках клеток внутри супрабластопоральной области и крыши бластоцеля, мы подсчитали плотность розеток в каждом из этих регионов у 20 фиксированных эмбрионов, границы клеток которых были визуализированы фаллоидином. Плотность розеток вычисляли как отношение числа розеток к площади исследуемой области в мм². Среднее значение плотности розеток было достоверно выше в супрабластопоральной области (Таблица 1, Рис. 2В). Чтобы установить, какой вклад в обнаруженные различия средних вносит область эмбриона, мы применили дисперсионный анализ с повторными измерениями. Оказалось, что для каждого из эмбрионов средние значения плотности розеток в супрабластопоральной области и крыше бластоцеля значимо различаются вследствие региональной специфичности. Это означает, что частота встречаемости розеток выше в регионе с большими значениями механических напряжений.

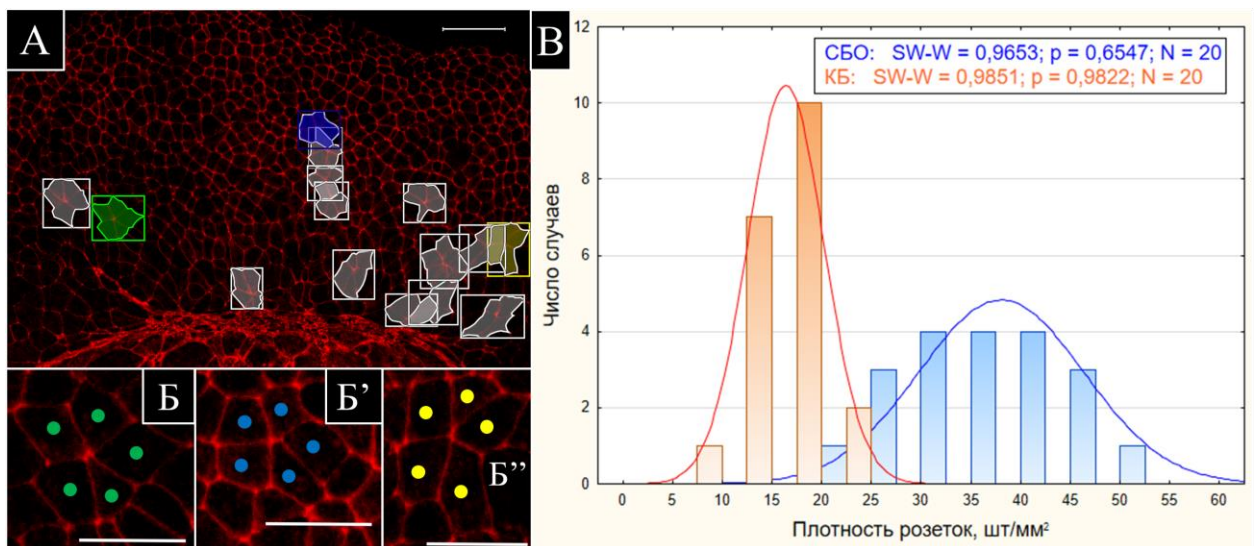


Рис. 2 Частота перегруппировок клеток в супрабластопоральной области интактной гастрюлы *X. laevis*. (А) Локализация розеток. Окрашивание на F-актин (красный цвет). Масштабный отрезок 100 мкм. (Б) Пример розетки. Точки – отдельные клетки в составе розетки, цвет точек соответствует цвету розетки на (А). Масштабный отрезок 50 мкм. (В) Гистограммы плотности розеток для исследованных эмбрионов. СБО - супрабластопоральная область (синяя гистограмма), КБ - крыша бластоцеля (оранжевая гистограмма), в рамке: SW-W – статистика Шапиро-Уилка, p – p-значение, n – число эмбрионов.

Исследование распределения механических напряжений в супрабластопоральной области *Xenopus laevis* с помощью анализа микродеформаций ткани

Анализ пространственно-временной динамики смещений клеток

Чтобы охарактеризовать пространственное распределение морфогенетических движений в супрабластопоральной области *X. laevis*, измерили скорости смещения клеток и сонаправленность их движений в исследуемой области эмбриона ($n = 1$), включающей 88 клеток (Рис. 3А).

Чтобы статистически оценить пространственную неоднородность скоростей движения клеток, исследуемую область подразделили на 3 региона, состоящие из 29-30 клеток (Рис. 3Б). Низкая скорость смещения клеток наблюдалась одновременно с низкой сонаправленностью движений. Так, значение параметра порядка в регионе 3 превышает среднее по всем клеткам образца в течение первых 6 минут наблюдения. При этом, в первые 15-18 минут наблюдения средняя скорость клеток в регионе 3 растёт быстрее, чем в регионах 1 и 2, и в среднем по всем клеткам исследуемой области. И, наоборот, при высокой скорости движений клеток наблюдали высокую сонаправленность их смещений. Таким образом, скорость и сонаправленность смещений клеток выше в регионе 3, чем в регионах 1 и 2.

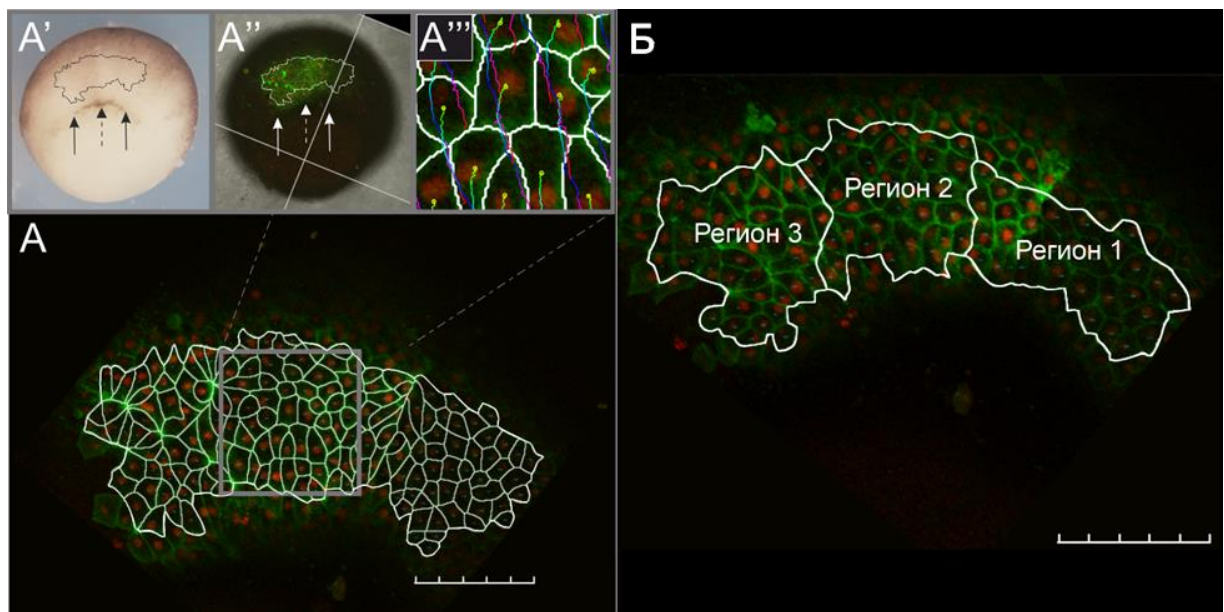


Рис. 3. Анализ пространственно-временной динамики смещений клеток (А) Дорсальная область эмбриона *X. laevis* на стадии 10-10,5 с распознанными клеточными границами (А) и положение исследуемой области в эмбрионе (А', А''). Пример траекторий движения клеток (А'''). Прижизненное маркирование мембран и ядер с помощью GAP43-GFP (зелёный) и H2B-RFP (красный) соответственно. (Б) Для оценки динамики пространственной однородности смещения клеток вдоль медиолатеральной оси вся исследуемая область была разбита на три региона по 29-30 клеток. Прижизненное маркирование аналогично (А). Масштабный отрезок 100 мкм, деление – 20 мкм.

Анализ пространственно-временной динамики микродеформаций

Чтобы описать распределение механических напряжений в супрабластопоральной области гастрюлы, мы провели анализ микродеформаций. Известно, что в эпиэктодерме *X. laevis* действующие силы пропорциональны возникающим в ткани деформациям [Luu и др., 2011]. Поэтому микродеформации являются адекватной оценкой механических напряжений в ткани. Под микродеформациями понимали относительное изменение расстояние между геометрическим центрами контактирующих клеток на последовательных кадрах цейтраферной съёмки: разность расстояния между выбранной парой клеток на текущем и предыдущем кадрах, делёную на расстояние между этой парой клеток на предыдущем кадре. Анализ выполнили внутри тех же трёх регионов супрабластопоральной области для того же эмбриона, который был описан в предыдущем разделе (Рис. 3).

Таблица 2 Значение U-Критерия Манна-Уитни для попарного сравнения средних абсолютных значений микродеформаций внутри регионов супрабластопоральной области.
* – статистически значимые отличия средних.

	Регион 1	Регион 2	Регион 3
Регион 1	-	U = 2015.0, p = 0.14	U = 1232.0, p* = 0.01
Регион 2	U = 2015.0, p = 0.14	-	U = 1005.0, p* << 0.05
Регион 3	U = 1232.0, p* = 0.01	U = 1005.0, p* << 0.05	-

Средние абсолютных значений микродеформаций в регионе 3 (1,92%) статистически значимо отличаются от средних в двух других регионах, в то время как между Регионами 1 и 2 такой разницы нет (1,78% и 1, 70% соответственно) (Таблица 2). Таким образом, регион 3 испытывает большее растягивающее усилие, чем регионы 1 и 2.

Анализ динамики перегруппировок клеток в супрабластопоральной области и её связь с микродеформациями ткани

Чтобы установить зависимость динамики перегруппировки клеток от действующих в ткани напряжений, мы подсчитали число розеток в каждом из регионов (Рис. 3Б). На кадрах съёмки удалось идентифицировать 12 розеток, из них 8 были локализованы в регионе 3, 3 – в регионе 2, и 1 – в регионе 1. Учитывая имеющиеся данные по фиксированным эмбрионам [Evstifeeva, Kremnyov, Velousov, 2010], регион 3 был идентифицирован как медиальный регион супрабластопоральной области, где наиболее активно протекает процесс инволюции, а регионы 1 и 2 - как участки одной из латеральных зон супрабластопоральной области.

Ориентация клеточных границ между формирующихся при распаде розетки тяжами клеток может служить оценкой внутритканевой деформации [Blankenship и др., 2006]. В связи с этим, мы проанализировали протяженность и ориентацию границ клеток при распаде розеток (Рис. 4А-А'''). Формирующиеся границы оказались сонаправлены антерипостериорной оси, отклоняясь от неё на $5,1^\circ$, $6,7^\circ$ и $8,6^\circ$. Таким образом, при распаде розетки новые границы формируются параллельно антерипостериорной оси. Кроме того, формирующиеся границы оказываются параллельны линиям наибольшего напряжения внутри супрабластопоральной области [Belousov, 2015]. Это позволяет нам предположить, что наблюдаемые перестройки компенсируют усиленное растяжение поверхностного слоя клеток в ходе инволюции.

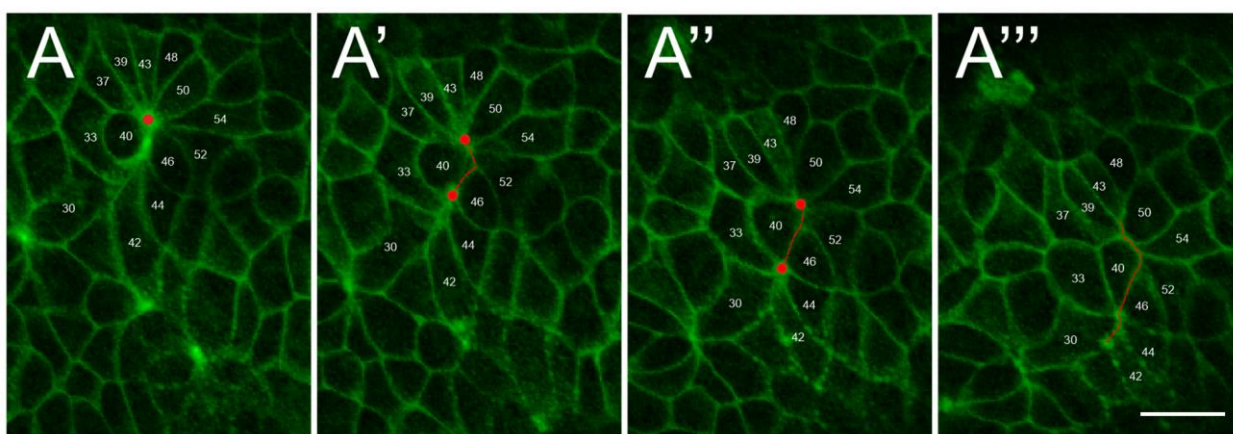


Рис. 4. Последовательные этапы распада клеточной розетки у *X. laevis*. Конфигурация розетки на 0-й, 20-й, 40-й и 60-й минуте съемки (А, А', А'', и А''' соответственно). (А', А'') - распад розетки на две новых. Прижизненное маркирование мембран с помощью GAP43-GFP (зелёный). Числа (белый шрифт) - порядковый номер клетки, красная точка – центр розетки, красная пунктирная линия – формирующаяся новая граница контакта между клетками розетки. Масштабный отрезок 20 мкм.

Чтобы установить зависимость перегруппировок клеток от микродеформаций, мы проанализировали форму границ клеток на полученной серии изображений в каждом из трёх регионов (Рис. 3Б). Так как клетки, вовлекающиеся в перегруппировки в составе розеток, имеют более вытянутую форму, в качестве численной характеристики формы клеток мы использовали значение эксцентриситета. Эксцентриситет изменяется от 0 до 1, где значения, близкие к 0 соответствует круглым клеткам, а близкие к 1 – сильно вытянутым.

Нам удалось выявить различия средних значений эксцентриситета между регионами. Средние эксцентриситета в Регионе 3 (0,8) статистически достоверно отличаются от остальных регионов, в то время как между Регионами 1 и 2 такой разницы нет (0,75 и 0,76 соответственно). Т.о. в регионе 3 средние значения и микродеформаций, и эксцентриситета достоверно выше, чем в регионах 1 и 2.

Чтобы связать динамику микродеформаций с динамикой эксцентриситета провели корреляционный анализ статистических показателей

значений эксцентриситета клеток на кадре со средними статистических показателей микродеформаций в регионах. Наиболее выраженные корреляционные связи были обнаружены в Регионе 2 (Таблица 3).

Таблица 3 Анализ корреляции статистических показателей эксцентриситета клеток и микродеформаций для Региона 2. КВ – коэффициент вариации. * – значимые коэффициенты.

		ЭКСЦЕНТРИСИТЕТ			
Д Е Ф О Р М А Ц И И		среднее	дисперсия	медиана	КВ
	среднее	0,58*	-0,56*	0,31*	-0,56*
	дисперсия	0,44*	-0,4*	0,2	-0,41*
	медиана	0,49*	-0,47*	0,27*	-0,46*
	КВ	-0,03	0,05	-0,07	0,03

Хотя средние значения микродеформаций и эксцентриситета клеток достоверно выше в регионе 3, значимой корреляции между микродеформациями и эксцентриситетом обнаружить не удалось. Однако в регионе 2 наблюдали отрицательную корреляцию средних значений микродеформаций, средних значений дисперсии и коэффициента вариации, а также положительную – средних значений эксцентриситета и средних значений микродеформаций. Таким образом, величина результирующих микродеформаций, а, значит и механических сил, отрицательно коррелирует с изменчивостью количества клеток, вовлечённых в перегруппировки в слабо деформируемых регионах.

Разработка установки для контролируемой одноосевой деформации эмбриональных тканей.

Для экспериментальной проверки предположения, что клеточные перестройки компенсируют усиленное растяжение ткани в ходе процесса гастрюляции, мы провели работу по разработке установки для контролируемого автоматизированного растяжения эксплантатов эмбриональной ткани (Рис. 1) (нами получен патент RU2723726C1). Применённые в установке систем перемещения позволяют добиться дискретности хода в 0,25 мкм, что в 80 раз ниже среднего диаметра клеток супрбластопоральной области *X. laevis*.

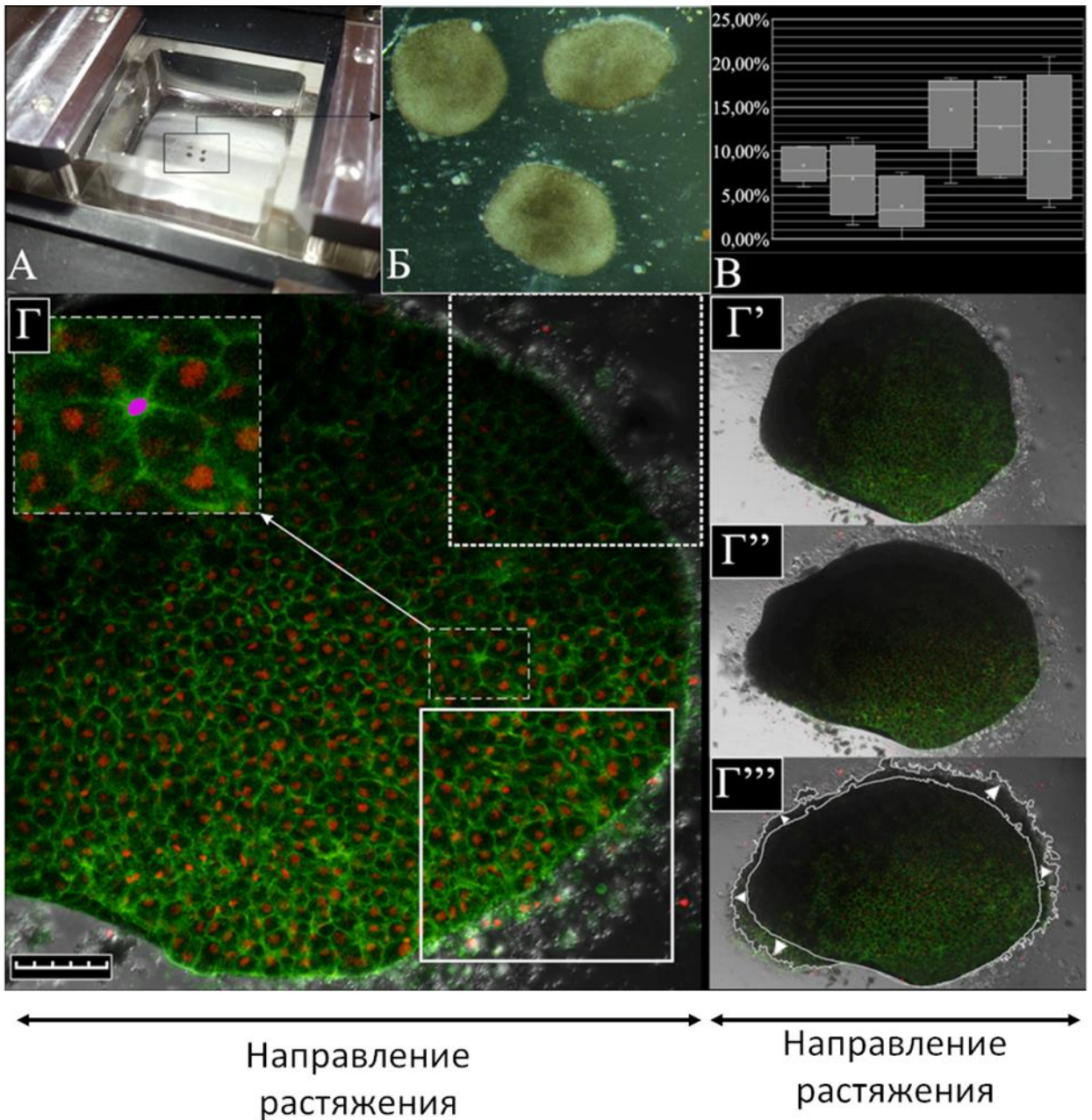


Рис. 5 Искусственная деформация эксплантатов крыши бластоцеля гастролы *X. laevis*. (А) Инкубационная камера с эксплантатами крыши бластоцеля. (Б) Эксплантаты крыши бластоцеля после прикрепления к субстрату. (В) Эффективность искусственной деформации эксплантатов: среднее удлинение (крестик) и эксклюзивная медиана (линия) для 6 групп из 4-6 эксплантатов. (Г) Кадр из центрифужной съёмки эксплантата после растяжения, вид со стороны гипозектодермы. Длина мерного отрезка 100 мкм. (Г'-Г''') – фотографии эксплантата крыши бластоцеля перед растяжением (Г'), после растяжения (Г'') и по окончании часовой центрифужной съёмки (Г'''); белый контур: границы эксплантата в начале и в конце съёмки, стрелки – направление смещения границы). Прижизненное маркирование мембран и ядер с помощью GAP43-GFP (зелёный) и H2B-RFP (красный) соответственно.

Влияние искусственной деформации на перегруппировки клеток в эксплантатах эмбриональной ткани гаструлы *Xenopus laevis*

Определение эффективности искусственной деформации эксплантатов эмбриональной ткани

Эффективность растяжения ткани рассчитывали как частное среднего удлинения в группе из 4-6 эксплантатов и удлинения самой инкубационной камеры (Рис. 5В). Амплитуда растяжения камеры для всех групп была одинакова и составляла 20% при времени растяжения 10 секунд. Такое малое время растяжения позволяет достичь наибольшей скорости деформации и, что обеспечивает наилучшую проверку степени адгезии эксплантата ко дну камеры.

При выбранных концентрации фибронектина и протоколе его нанесения растяжение субстрата передаётся на эксплантаты с эффективностью $54,7\% \pm 26,5\%$ [Bredov, Luchinskaya, Volodyaev, 2022], что, в целом, согласуется с описанными в литературе данными (от 56% до $77,2 \pm 20,4\%$ [Nestor-Bergmann и др., 2019; Wang и др., 2001]).

Исследование взаимосвязи между механической силой и перегруппировкой клеток в растянутых эмбриональных тканях

Для исследования влияния искусственно приложенной механической силы на перегруппировку клеток, фрагменты крыши бластоцеля помещали в инкубационную камеру гипоектодермой на субстрат, аккуратно прижимали покровным стеклом на силиконовых ножках (Рис. 5А), и инкубировали в течение двух часов для стимуляции адгезии к матриксу. Затем покровное стекло снимали (Рис. 5Б).

Часть эксплантатов (группа "*прикреплённые*") фиксировали уже на этом этапе. Эксплантаты первой экспериментальной группы (группа "*тянутые*"). растягивались на 15-17% в течение 10 минут. При этом скорость растяжения была близка к физиологической [Evstifeeva, Luchinskaia, Belousov, 2018]. По окончании растяжения, эксплантаты оставляли в растянутом состоянии на 30 и 60 мин, после чего фиксировали (через 40 и 70 минут после начала эксперимента) (Рис. 6А). Эксплантаты второй экспериментальной группы (группа "*нетянутые*") не подвергались растяжению, но фиксировались через то же время, что и *тянутые* (т.е. через 40 и 70 минут после начала эксперимента).

Таким образом, мы сравнивали между собой три группы эксплантатов: просто *прикреплённые*, *тянутые* и *нетянутые*. У эксплантатов из каждой группы подсчитывали число розеток (Рис. 6Б-Б''') и вычисляли плотность розеток как отношение числа розеток к площади исследуемой области в мм^2 .

Плотность розеток вычисляли как отношение числа розеток к площади исследуемой области в мм².

В обоих экспериментальных группах средние значения плотности розеток статистически достоверно отличалось от таковых в *прикрепленных* эксплантатах (Рис. 7А, ПЭ). При попарном сравнении экспериментальных групп (т.е. *нетянутых*, зафиксированных через 40 минут, с *нетянутыми*, зафиксированных через 70 минут, и аналогично для *тянутых*), были обнаружены достоверные различия между экспериментальными группами: и средние (Рис. 7А), и дисперсии (Рис. 7Б) статистически значимо отличались.

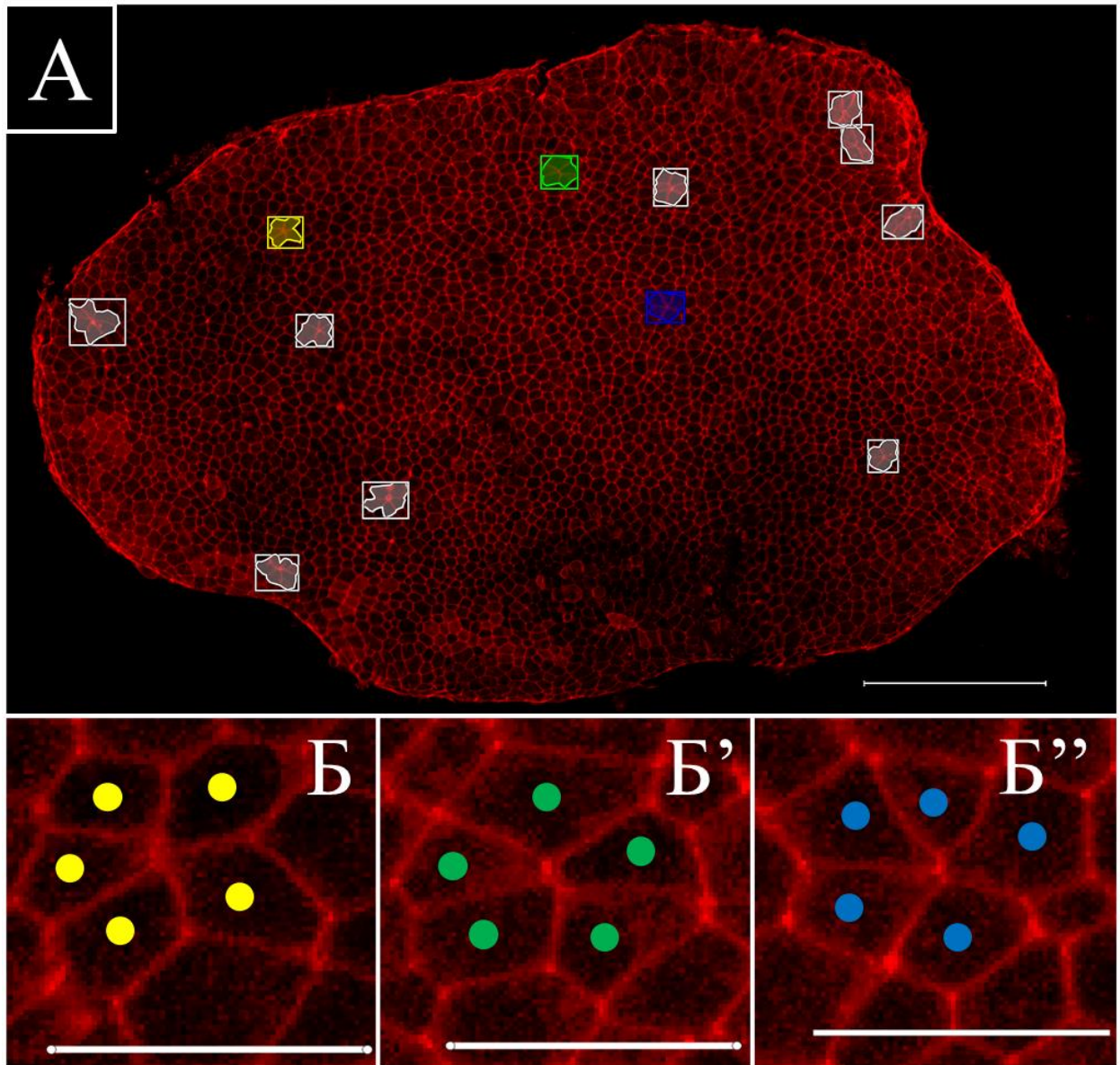


Рис. 6. Клеточные розетки в искусственно деформированных эксплантатах крыши бластоцеля *X. laevis*. (А) пространственная локализация розеток на примере *тянутого* эксплантата, зафиксированного через 40 минут после начала эксперимента. Масштабный отрезок 100 мкм. (Б) пример клеточных розеток. Точки – отдельные клетки в составе розетки, цвет точек соответствует цвету розетки на А. Окрашивание на F-актин (красный цвет). Масштабный отрезок 50 мкм

Таким образом, за время эксперимента средние значения плотности клеточных розеток статистически значимо увеличиваются и у *нетянутых*, и у *тянутых* эксплантатов. Однако, изменчивость плотности клеточных розеток у *нетянутых* эксплантатов возрастает больше, чем у *тянутых*.

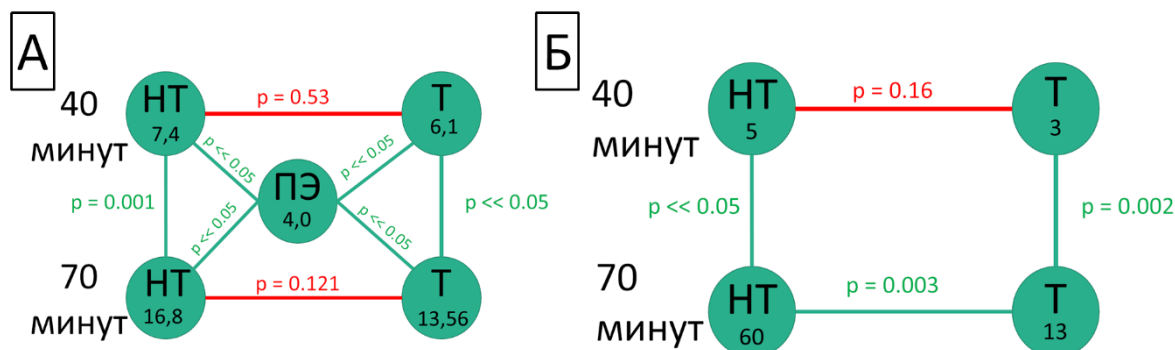


Рис. 7 Взаимосвязь между механической силой и перегруппировкой клеток в растянутых эксплантатах крыши бластоцеля. (А) Попарное сравнение средних значений плотности клеточных розеток в эксплантатах крыши бластоцеля. Даны средние значения и р-значения для U-Критерия Манна-Уитни. (Б) Сравнение дисперсий плотности клеточных розеток в эксплантатах крыши бластоцеля. Даны значения дисперсии и р-значения для F-статистики. Красные линии - отсутствие достоверного различия, зеленые – наличие достоверного различия. НТ - нетянутые эксплантаты, Т – тянутые эксплантаты, ПЭ – прикрепленные эксплантаты.

Анализ пространственно-временной динамики смещений клеток

Мы также исследовали перегруппировки клеток в растянтом эксплантате *in vivo* ($n = 1$). За время съёмки периферические 4-5 рядов клеток эксплантата осуществляли миграцию в радиальном направлении, т.е. вдоль оси, соединяющей центр эксплантата с периферией (Рис. 5Г''', стрелки). При этом, наиболее активно процесс миграции протекал в области границ эксплантата, ориентированных перпендикулярно направлению растяжения. Участок такой границы выделен на Рис. 5Г пунктирной рамкой. Миграция клеток, расположенных вдоль этих границ, привела к их смещению примерно на 35-60 мкм вдоль оси растяжения. Клетки, расположенные вдоль границ эксплантата, параллельных направлению растяжения также демонстрировали подвижность, однако, мигрирующий край смещался относительно изначального положения не более чем на 10 мкм (Рис. 5Г, фрагмент, выделенный сплошной рамкой). Таким образом, миграция клеток и смещение границы эксплантата преимущественно происходила в направлении растяжения эксплантата.

Заключение

Целью диссертационной работы было охарактеризовать взаимосвязь между механической силой и клеточными перегруппировками в эмбриональных тканях. Была выдвинута гипотеза о том, что механическая сила, действующая на эмбриональную ткань в ходе морфогенетических

процессов, приводит к повышению частоты клеточных перегруппировок, и это позволяет компенсировать деформацию эмбриональной ткани под действием механической силы.

Частоту клеточных перегруппировок оценивали с помощью подсчета "клеточных розеток", характерных для эпителия морфологических структур, представляющих собой апексы контактирующих клеток, границы которых пересекаются в одной точке. Наличие розеток в ткани свидетельствует о том, что её клетки активно перегруппировываются: редуцируют старые межклеточные контакты и формируют новые, меняя своих соседей. В работе впервые было показано, что плотность клеточных розеток достоверно выше в супрабластопоральной области гастролы, чем в крыше бластоцеля. Дисперсионный анализ подтвердил, что наблюдаемые различия плотности розеток определяются именно особенностями регионов гастролы, а не изменчивостью разных эмбрионов (Таблица 1). Таким образом, мы доказали, что частота перегруппировок клеток достоверно выше в супрабластопоральной области эмбриона, которая является наиболее механически напряжённым регионом, ткань которого вовлечена в морфогенетические процессы, связанные с коллективными движениями клеток. Тем самым, в работе показано, что частота клеточных перегруппировок в эмбриональной ткани зависит от значений механических напряжений.

В работе впервые было выполнено детальное картирование механических напряжений внутри супрабластопоральной области. Эта задача была выполнена с помощью анализа динамики микродеформаций ткани на последовательных кадрах цейтраферной съемки. Под микродеформациями понимали изменение расстояния между геометрическими центрами контактирующих клеток за время между двумя последовательными кадрами цейтраферной съемки. Оказалось, что величина механических напряжений, как и число клеточных розеток, достоверно выше в медиальном регионе супрабластопоральной области (Таблица 2). Именно этот регион, по сравнению с латеральными регионами, наиболее активно вовлечен в процесс инволюции. Нам не удалось выявить корреляционной связи между величиной механических напряжений в ткани и количеством клеток, вовлечённых в перегруппировки, в медиальном регионе. Однако, такая корреляция была достоверно показана для более латеральных регионов (Таблица 3). Это можно объяснить следующим образом: в регионе с высокими значениями механических напряжений клетки быстрее выполняют направленные перегруппировки, релаксирующие механические напряжения. При этом происходит быстрое возникновение и последующий "распад" клеточных розеток. Клетки, входящие в розетки, в ходе перегруппировки выстраиваются вдоль линий действия механической силы, удлиняя ткань в этом направлении и снижая величину механических напряжений.

В работе мы впервые экспериментально проверили гипотезу о влиянии механических сил на перегруппировки клеток. Для выполнения этого

эксперимента мы разработали автоматизированную установку для контролируемой деформации эмбриональной ткани (получен патент РФ RU2723726C1). С использованием разработанной и сконструированной установки эмбриональная ткань - эксплантаты крыши бластоцеля - была растянута с применением силы, находящейся в физиологическом диапазоне значений. Воздействие такой силы не привело к увеличению среднего значения числа розеток в эксплантатах, однако достоверно снизило вариабельность этого показателя между эксплантатами, полученными от разных эмбрионов. Эти результаты подтверждают гипотезу о регуляторной роли механических сил в процессе клеточных перегруппировок. Именно поле механических напряжений позволяет поддерживать подвижность клеток в ткани на необходимом стабильном уровне, что обеспечивает устойчивость морфогенетических процессов в ходе эмбрионального развития.

Полученные данные дают численное экспериментальное подтверждение координирующей роли механических сил в регуляции морфогенетических процессов. Наряду с молекулярно-генетическими механизмами регуляции развития, механические силы поддерживают нормальный ход эмбриогенеза, а нарушения конфигурации поля механических напряжений может лежать в основе возникновения его нарушений.

Выводы

1. Частота встречаемости клеточных перегруппировок достоверно выше в регионе, характеризующимся большими значениями механических напряжений. Так, в супрбластопоральной области гастролы *Xenopus laevis* частота клеточных перегруппировок выше, чем в крыше бластоцеля, где величина механических напряжений ниже.
2. Величина механических напряжений максимальна в медиальном регионе супрбластопоральной области гастролы *Xenopus laevis*, характеризующимся высокими скоростями и сонаправленностью движений клеток, и снижается в латеральных регионах. Таким образом, распределение механических напряжений в супрбластопоральной области отражает активность инволюционных движений в её регионах.
3. Не выявлена корреляционная связь между величиной механических напряжений в ткани и частотой клеточных перегруппировок в медиальном регионе супрбластопоральной области. Однако такая связь обнаружена в более латеральных регионах, где движения инволюции протекают менее активно.
4. Разработана автоматизированная установка, позволяющая осуществлять контролируемую деформацию эмбриональной ткани. С помощью установки проведены эксперименты для установления взаимосвязи механической силы с перегруппировками клеток в эмбриональных тканях.
5. Изменчивость частоты клеточных перегруппировок достоверно снижается при воздействии на эмбриональную ткань механической силы в физиологическом диапазоне значений. Это свидетельствует о том, что поле

механических сил координирует коллективные движения клеток и, таким образом, обеспечивает устойчивость морфогенетических процессов.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ имени М.В. Ломоносова

1. **Bredov D.**, Volodyaev I. Increasing complexity: Mechanical guidance and feedback loops as a basis for self-organization in morphogenesis // Biosystems. – 2018. – Т. 173. – С. 133-156. IF (WoS) = **1,957** (1,44/0,63)*
2. **Бредов Д.В.**, Володяев И.В., Лучинская Н.Н. Морфометрическое исследование пространственно-временной динамики деформаций эмбриональной ткани при морфогенетических движениях // Онтогенез. – 2021. – Т. 52. – С. 317-328. IF (WoS, РИНЦ) = **0,744** (0,69/0,5)
3. **Бредов Д.В.**, Володяев И.В., Лучинская Н.Н. Разработка методики контролируемой деформации эмбриональных тканей для исследования механозависимых движений клеток // Онтогенез. – 2022. – Т. 53. – С. 136-143. IF(WoS, РИНЦ) = **0,744** (0,44/0,33)

Другие публикации по теме диссертации

Патенты

1. Патент РФ 2723726. Установка для высокоточного одноосевого растяжения эластичных субстратов для культивирования клеток и эмбриональных тканей / **Бредов Д. В.**, Володяев И. В., Мезин А. В.; Заявл. 28.10.2019. Оpubл. 17.06.2020.

Тезисы докладов и стендовых сообщений

1. **Бредов Д.В.**, Володяев И.В. Статистическое исследование влияния механической деформации на клеточные движения в раннем развитии *xenopus laevis*. VI СЪЕЗД БИОФИЗИКОВ РОССИИ, Сочи, Россия, 16-21 сентября, 2019
2. **Бредов Д.В.**, Володяев И.В. Разработка методики контролируемой деформации эмбриональных тканей для исследования механозависимых движений клеток. XVIII конференции-школы с международным участием «АКТУАЛЬНЫЕ ПРОБЛЕМЫ БИОЛОГИИ РАЗВИТИЯ», Москва, Россия, 14-19 октября, 2019
3. **Bredov D.V.**, Volodyaev I.V., Mechanobiology of collective cell movements. Contemporary morphogenesis, England, London, 7-8 October 2019

* В скобках приведен объем публикации в условных печатных листах и вклад автора в условных печатных листах.