

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М.В. ЛОМОНОСОВА

БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи

Бредов Денис Владимирович

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

1.5.23 – Биология развития, эмбриология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель:

д. б. н. Краус Юлия Александровна

Москва – 2022

Оглавление

Введение	5
Актуальность темы исследования.....	5
Степень разработанности темы исследования.....	6
Цель работы.....	7
Задачи исследования:	8
Объект и предмет исследования.....	8
Научная новизна работы	8
Теоретическая и практическая значимость.....	9
Методология и методы исследования	9
Достоверность	10
Апробация работы	11
Публикации	11
Личный вклад автора в проведение исследования.....	12
Положения, выносимые на защиту	12
Обзор литературы	13
Регистрация механических сил в раннем развитии.....	13
Роль механических сил в регуляции движений клеток.....	22
Молекулярные механизмы реакции клеток на механические силы.....	25
Материалы и методы	36
Материалы	36
Методы.....	37
Получение эмбрионов	37
Инъекция РНК.....	38
Микрохирургические операции	39
Окрашивание на F-актин.....	40
Искусственная деформация эксплантатов	40

Конфокальная микроскопия	42
Морфометрический анализ	43
Статистический анализ.....	46
Результаты	47
Исследование частоты перегруппировок клеток в регионах интактной гастрюлы <i>Xenopus laevis</i> , качественно различающихся по величине механических напряжений.	47
Исследование распределения механических напряжений в супрабластопоральной области <i>Xenopus laevis</i> с помощью анализа микродеформаций ткани	52
Анализ пространственно-временной динамики смещений клеток	52
Анализ пространственно-временной динамики микродеформаций	57
Анализ динамики перегруппировок клеток в супрабластопоральной области и её связь с микродеформациями ткани	59
Разработка установки для контролируемой одноосевой деформации эмбриональных тканей.	64
Влияние искусственной деформации на перегруппировки клеток в эксплантатах эмбриональной ткани гастрюлы <i>Xenopus laevis</i>	68
Определение эффективности искусственной деформации эксплантатов эмбриональной ткани	68
Исследование взаимосвязи между механической силой и перегруппировкой клеток в растянутых эмбриональных тканях	68
Анализ пространственно-временной динамики смещений клеток	76
Обсуждение	78
Исследование роли механических сил в регуляции перегруппировок клеток в нормальном развитии	78
Экспериментальное исследование роли механических сил в регуляции перегруппировок клеток.....	80
Заключение	82

Выводы.....	85
Благодарности	86
Список литературы	87

Введение

Актуальность 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 [65], для каждого из которых подробно изучены механизмы их регуляции. Среди регуляторных механизмов наиболее значимую роль играют градиенты сигнальных факторов [14], а также физическое состояние межклеточного матрикса [57].

Однако в основе деформации любого физического тела, в том числе и биологических тканей, лежит механическая сила [17, 47]. Поэтому, чтобы в полной мере ответить на вопрос, почему формообразование 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 [5, 68]. Изменение этого поля может приводить к нарушениям развития [20].

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 [49]. В том числе, механические силы могут влиять на подвижность клеток внутри ткани [8, 74] и перестройку клеточных контактов [77]. При этом клетки внутри ткани сохраняют общее направление миграции только при наличии между ними механического контакта [18, 66].

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.

Степень разработанности темы исследования

Объект данного исследования - эмбрион шпорцевой лягушки *Xenopus laevis* - является перспективной моделью для изучения морфогенетических процессов, в том числе механизированного поведения клеток, составляющих эмбриональные ткани [67].

На сегодняшний день экспериментально показано, что воздействие механической силы способно напрямую влиять на направление и количество клеточных выростов у клеток мезэнтодермы гастролы *X. laevis*. Приложение механической силы к отдельной клетке инициирует формирование ламеллоподий на полюсе клетки, противоположном точке приложения силы [74]. Схожие результаты продемонстрированы и на тканевом уровне. Было показано, что первые несколько рядов клеток мигрирующей мезэнтодермы, развивающиеся при взаимодействии с субстратом наиболее высокие напряжения в области клеточных контактов, формируют более стабильные ламеллоподии и характеризуются меньшим разбросом ориентации ламеллоподий. В то же время, клетки, более удаленные от миграционного фронта, развивают в области клеточных контактов меньшие напряжения. Для этих клеток характерны менее стабильные ламеллоподии и больший разброс их ориентации [66]. Было также продемонстрировано, что клетки миграционного фронта мезодермы генерируют силу величиной около 40 нН. Эта сила действует, в том числе, и на контактирующие с ними клетки осевой мезодермы. Подавление миграции клеток фронта приводило к нарушению медиолатеральной интеркаляции в осевой мезодерме [28].

Для экспериментального исследования роли механических напряжений в регуляции движений клеток на тканевом уровне более удобной моделью являются эпителиальные ткани. Так как ключевой функцией эпителиальных тканей является создание барьера между организмом и внешней средой, одной из основных отличительных морфологических черт эпителиев является выраженная механическая связность клеток через апикальный комплекс клеточных контактов, включающий адгезионные и плотные контакты [32]. Эта морфологическая особенность эпителиев значительно облегчает экспериментальное приложение механической силы ко всем клеткам в составе пласта. Тем не менее, для эпителиальных тканей роль механических сил в регуляции клеточных движений и перегруппировок практически не изучена. Для эксплантатов эпиэктодермы *X. laevis* было продемонстрировано, что приложение механической силы способно инициировать движения клеток, схожие с движениями конвергентной интеркаляции в осевой мезодерме [6]. Однако, скорость деформации ткани в этих экспериментах была выше, чем в интактных эмбрионах [13, 21]. К тому же растяжение производилось дискретными шагами, в то время как в нормальном развитии деформация тканей происходит равномерно.

Таким образом, тема данного исследования в достаточной степени разработана. Это позволило сформулировать цель работы и задачи, необходимые для её достижения; подобрать объект и методы исследования. Тем не менее, наши знания по данной теме - регуляторной роли механической силы при перегруппировках клеток в эпителиальных тканях эмбриона - явно недостаточны. Диссертационное исследование направлено на восполнение имеющихся пробелов.

Цель работы

Охарактеризовать взаимосвязь между механической силой и клеточными перегруппировками в тканях гастрюлы амфибии *Xenopus laevis*.

Задачи исследования:

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

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 перегруппировки клеток эмбриональной эпиектодермы.

Научная новизна работы

Ключевой научной идеей данной 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 больше 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

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 перегруппировки 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.

Работа выполнялась на нескольких моделях. Исследования интактных эмбрионов включали в себя фиксацию эмбрионов, визуализацию границ клеток (кортикального слоя F-актина) и последующую съёмку на конфокальном микроскопе. Немаловажной частью работы являлась также прижизненная цейтраферная съёмка эмбрионов. Для этого осуществляли визуализацию границ и ядер клеток с помощью инъекции РНК флуоресцентных маркёров, прижизненную съёмку эмбрионов с помощью конфокального микроскопа, автоматизированное распознавание границ клеток на кадрах съёмки с помощью специального ПО, морфометрический анализ полученных изображений. Помимо интактных эмбрионов, исследования выполнялись на фрагментах эмбриональной ткани - эксплантатах крыши бластоцеля. Эксперименты с применением этой модели включали в себя микрохирургические операции, растяжение эксплантатов на эластичном субстрате, фиксацию и визуализацию кортикального F-актина.

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

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 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).

Во всех опубликованных работах вклад автора является определяющим. Автор самостоятельно определил направление исследования и осуществил анализ литературы по теме работы, результатом которого стала публикация обзорной статьи в журнале “Biosystems”. Автор принимал активное участие в формулировке целей и задач исследования, выбрал адекватные поставленным задачам экспериментальные методики, в том числе ранее не применявшиеся в его исследовательском коллективе прижизненную цейтраферную съёмку движений клеток на конфокальном микроскопе и методику контролируемого растяжения эксплантатов эмбриональной ткани с возможностью прижизненного наблюдения. Для реализации последней автор самостоятельно спроектировал прототип установки для высокоточного одноосевого растяжения эластичных клеточных подложек и принимал активное участие в реализации прототипа установки, о чём свидетельствует патент РФ RU2723726C1, в котором

Д. В. Бредов является соавтором. Адекватность и воспроизводимость методики искусственной деформации эксплантатов была подтверждена экспериментально и опубликована в соавторстве с Н. Н. Лучинской и И. В. Володяевым [10]. Автор принимал активное участие в постановке научных задач, проведении экспериментальных исследований, анализе и статистической обработке полученных результатов. Автором была проведена значительная работа над текстом статей и подготовкой иллюстративного материала. Также автор диссертации принимал непосредственное участие в представлении публикаций в редакции журналов и переписке с редакторами и рецензентами.

Со степенью личного вклада соискателя в опубликованные работы более подробно можно ознакомиться в разделе «Список литературы».

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.

Обзор литературы

Эмбриональное развитие организмов сопровождается выраженным изменением их формы. Изучение процессов, лежащих основе наблюдаемого изменения формы, требует не только изучения сигнальных каскадов и клеточных поведения, но и механических сил, так как источником движения любого физического тела, в том числе и клеток в биологических тканях, является механическая сила [17, 47]. Поэтому для детального изучения механизмов морфогенеза необходимо локализовать механические силы и изучить, как именно они приводят к изменению формы эмбриона.

Регистрация механических сил в раннем развитии.

Механическую силу определяют как количественную меру взаимодействия исследуемого тела с другими телами, в результате которого происходит изменение движения исследуемого тела [81]. Из этого определения следует, что изменение движения тела (в т.ч. и клеток в ткани) возможно только при действии на него нескомпенсированных внешних сил [47, 82]. Так как сила вводится для ответа на вопрос о причине изменения движения тела, её относят к динамическим характеристикам движения. Характер движение тела (т.е. зависимость координат от времени) описывают вектором перемещения, а также его первой и второй производными – скоростью и ускорением. Эти величины называют кинематическими характеристиками движения. Связь между динамическими и кинематическими характеристиками движения формализована в виде второго закона Ньютона: сумма всех действующих на тело сил \vec{F} компенсируется изменением импульса $\vec{p} = m\vec{v}$ тела: $\vec{F} = \frac{d(m\vec{v})}{dt}$ [48, 81, 82]. Так как вектор результирующей силы и вектор скорости сонаправлены, то, если мы знаем действующие на тело силы, мы можем предсказать траекторию движения тела. Верно и обратное: по траектории движения тела мы можем определить направление действующей на него силы.

Этот принцип применяется для локализации механических сил в эмбриональных тканях. Проследив траектории движения отдельных клеток, можно сделать предварительный вывод об ориентации сил, действующих внутри ткани. Если клетки преимущественно движутся в одном направлении, и, при этом, скорости движения различаются вдоль оси миграции, а сами клетки практически не изменяют относительного расположения (т.е. мы не наблюдаем направленную миграцию или перегруппировки), то можно сделать вывод о том, что в направлении движения клеток действует растягивающая сила. В таком случае действие силы может вызывать не только перемещение клеток (как и любого другого физического тела), но и изменение их формы, т.е. деформацию [81]. Поэтому, для более обоснованного вывода, анализ траектории и скоростей движения клеток дополняют измерением формы: преимущественное удлинение клеток в направлении миграции подтверждает предположение о наличии растягивающей силы [46]. Для этого, строго говоря, необходимо установить, что наблюдаемые в ткани деформации пропорциональны действию силы. Для различных тканей такая пропорциональность может наблюдаться в промежутке от первых нескольких секунд деформации [24] до нескольких часов [41].

Таким образом, действие силы может вызвать не только перемещение тела, но и его деформацию. Чтобы описать, что происходит в деформируемом теле с точки зрения механики, вводят понятие сплошной среды [83]. Тело рассматривают как набор материальных точек, связанных силами взаимодействия или подчинённых геометрическим связям, и постулируют, что законы Ньютона выполняются для каждой материальной точки в отдельности. Использование понятия материальной точки позволяет абстрагироваться от природы вещества и применять дальнейшие выводы к широкому спектру физических тел, в том числе к тканям эмбриона. Тогда, из третьего закона Ньютона следует, что в ответ на действие внешней силы между составляющими тело материальными точками возникнут взаимодействия, называемые внутренними силами, противодействующие деформации. Для описания распределения внутренних сил

в теле вводят понятие механического напряжения $\sigma = \frac{F}{S}$, где S – сечение тела, а F – результирующая внутренних сил, действующих на это сечение. Более точно механическое напряжение формулируется как предел отношения результирующей внутренних сил ΔF , действующей на бесконечно малую область сечения тела, к площади этой области ΔS : $\sigma = \lim_{\Delta S \rightarrow 0} \frac{\Delta F}{\Delta S}$ [80].

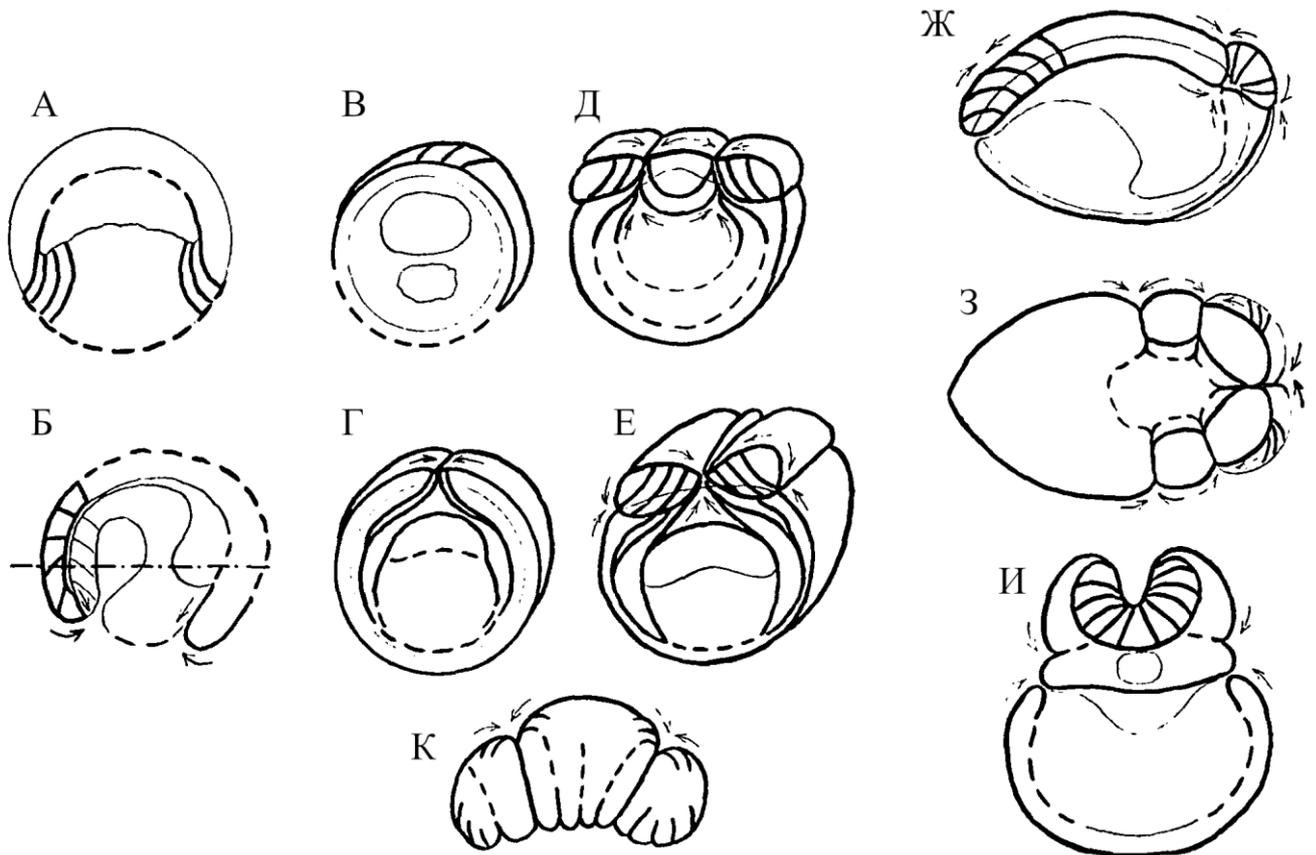


Рис. 1 Карты механических напряжений для нескольких последовательных стадий развития *Rana temporaria* и для типичного экто-мезодермального фрагмента. (А) Поздняя бластула; (Б) Средняя гастрюла, сагиттальный срез; (В) та же стадия, поперечный срез (по линии, указанной на Б); (Г) Переход от гастрюлы к нейруле, задняя область; (Д) Антериорная область ранней нейрулы; (Е) Постериорный регион, та же стадия (Г-Е - поперечные срезы). (Ж) Ранняя-средняя нейрула, сагиттальный разрез; (З) средняя/поздняя нейрула, фронтальный срез; (И) Аналогичная стадия, поперечный срез. (К) Типичный экто-мезодермальный фрагмент через 10-15 мин после эксплантации. Жирные контуры обозначают линии сконцентрированных напряжений; пунктирные контуры, линии рассредоточенных напряжений; тонкие линии, ненапряженные поверхности, разделяющие зародышевые листки (по [5]).

Соответственно, ткани эмбриона в ходе морфогенетических процессов, сопровождающихся активным генерированием сил, должны находиться в напряженном состоянии. Одними из первых это экспериментально продемонстрировала группа Белоусова, нанося в различные области эмбриона локальные надрезы [5]. Предположив, что скорость и амплитуда расхождения краёв надреза будут пропорциональны действовавшему в этой области напряжению, Белоусов и коллеги сравнили величину деформации после надреза для различных регионов эмбриональной ткани. Работа Белоусова продемонстрировала, что механические напряжения имеют неоднородное пространственное распределение (называемое также паттерном механических напряжений), качественно изменяющееся в ходе развития (Рис. 1). Хотя метод надрезов является травматичным, он сохраняет актуальность для задач, требующих качественной оценки механических сил в тканях [12, 28, 42].

Для количественного измерения внутренних сил в биологических тканях сейчас доступны различные методы, ключевым из которых является использование FRET-зондов. Эти зонды представляют собой два флуорофора, связанные эластичной молекулой, называемой линкером. Флуорофоры подбирают так, чтобы спектр эмиссии одного из них, донора, пересекался со спектром возбуждения другого, акцептора. Тогда при возбуждении донора происходит безызлучательный перенос энергии к акцептору, называемый резонансным переносом энергии по Фёрстеру (Förster Resonance Energy Transfer, FRET). Флуоресценция донора при этом затухает, а молекула акцептора, наоборот, переходит в возбуждённое состояние, и сама начинает флуоресцировать. Эффективность переноса энергии обратно пропорциональна расстоянию между флуорофорами в шестой степени, что позволяет измерять расстояние между этими молекулами. Таким образом, при действии силы на зонд линкер растягивается, и расстояние между молекулами флуорофоров увеличивается. Это, в свою очередь, приводит к падению эффективности переноса энергии в ходе FRET и падению интенсивности флуоресценции акцептора, по которому и

определяют изменение расстояния между флуорофорами. Хотя первично такой зонд регистрирует именно изменение расстояния, т.е. деформацию, он может использоваться и для измерения сил, так как линкер, связывающий флуорофоры в составе зонда, обладает известной упругостью. Зарегистрировав деформацию линкера под действием силы известной величины, например, с помощью технологии оптического пинцета [19, 25], исследователь может установить зависимость деформации зонда от приложенной силы. Зная эту зависимость, в дальнейшем можно вычислять силу, подействовавшую на зонд, по его деформации. FRET-зонды больше ориентированы на анализ субклеточных деформаций, однако могут использоваться для регистрации сил в масштабах ткани. Применение FRET-зондов позволило установить, что в области кадгериновых контактов эпителий поздней бластулы *X. laevis* находится под действием растягивающей силы величиной около 3 пН [31]. Начиная со стадии поздней гаструлы, напряжения в презумптивной нейральной эктодерме развиваемые в актиновом цитоскелете, начинают превышать таковые в латеральной эктодерме [76].

Качественно иной подход был предложен Streichan с соавторами, картировавшими механические напряжения в тканях гаструлы *Drosophila melanogaster* на основании пространственной анизотропии распределения миозина. Так как актомиозиновый комплекс является основным источником механической силы в ходе движений и перегруппировок клеток, неоднородность его распределения определяет пространственный паттерн механических напряжений в ткани. Измерив концентрацию миозина в различных регионах эмбриона, авторы обнаружили, что его пространственное распределение описывается тремя характерными паттернами, сменяющимися друг друга в ходе гаструляции. На основе этих измерений исследователи смоделировали карту механических напряжений, для каждого из трёх пространственных паттернов миозина [68]. Таким образом, данная работа косвенно показывает, что на каждой стадии развития *D. melanogaster* формируется специфический паттерн

механических напряжений. Этот результат принципиально схож с результатом работы группы Белоусова, картировавшей механические напряжения методом надрезов [5].

Однако, даже если мы количественно измерим действующие в ткани силы, соотношение $\sigma = \frac{F}{S}$ не объясняет нам, по какому закону механические напряжения генерируются в ткани, т.е. как свойства ткани влияют на распространение сил по ней. Для ответа на этот вопрос необходимо охарактеризовать противодействие ткани распространению механических сил, введя дополнительные соотношения, связывающие механические напряжения с деформацией тканей [17]. Такие соотношения называют определяющими уравнениями или уравнениями состояния. Наиболее известным примером определяющего уравнения является закон Гука: $F = -kx$. Реальный вид уравнений состояния может быть очень сложным, однако, практически всегда является комбинацией двух идеализированных случаев: абсолютно упругого тела и вязкой жидкости.

При действии внешней силы на абсолютно упругое тело взаимодействия между его элементами будут противодействовать деформации, и возникающие при этом внутренние силы будут стремиться вернуть тело к изначальной форме. Соответственно, после прекращения действия силы идеально упругое тело вернётся к исходной форме. Механическое напряжение σ связано с результирующей деформацией ε тела через соотношение:

$$\sigma = E\varepsilon$$

Коэффициент пропорциональности E в этом соотношении называют модулем упругости первого рода, или модулем Юнга. Он отражает противодействие упругого тела приложенной силе, и, таким образом, чем выше значения модуля Юнга, тем ниже деформация при одинаковом значении силы. Несмотря на то, что это соотношение сформулировано для идеализированного случая, подобная линейная зависимость встречается у многих реальных

материалов, если напряжение не превышает определённой величины, называемой пределом пропорциональности. При больших напряжениях упругое тело либо демонстрирует нелинейную упругость (т.е. величина модуля Юнга начнёт изменяться), либо разрушается. Область линейной зависимости напряжения от деформации выявляют экспериментально, т.е. прикладывая к телу силу известной величины и регистрируя значение результирующей деформации. На основании этих измерений строят график зависимости механического напряжения от деформации, который называют диаграммой деформирования. Значение тангенса угла наклона графика в области линейной зависимости численно равно модулю Юнга для данного материала.

Способность абсолютно упругого тела восстанавливать исходную форму при снятии нагрузки подразумевает, что работа сил не приводит к изменению взаимного положения его элементов. В эмбриональных тканях, напротив, клетки могут активно менять соседей, например, при коллективных движениях, делениях или перегруппировках. Подобное поведение клеток в составе ткани позволяет провести аналогию с жидкостями [27]. Жидкостью, в физическом смысле, считается вещество, способное неограниченно деформироваться под действием приложенной силы. Действие внешней силы также, как и в случае абсолютно упругого тела, приводит к возникновению в жидкости внутренних сил, противодействующих изменению положения частиц в нём, однако, не настолько выражено, как упругие взаимодействия в твёрдом теле. Поэтому, под действием внешних сил частицы жидкости меняют взаимное расположение, что приводит к релаксации напряжений. В результате частицы жидкости сохраняют изменённое расположение после прекращения действия силы. Так как жидкости способны неограниченно деформироваться под действием силы, механическое напряжение будет определяться не деформацией ε , а тем, насколько быстро под действием силы частицы меняют своё расположение $d\varepsilon$ со временем dt , т.е. скоростью деформации $\frac{d\varepsilon}{dt}$. То, насколько взаимодействие между частицами в конкретном

веществе замедляет скорость деформации при заданной величине силы, задаётся через коэффициент вязкости η . Таким образом, напряжение будет иметь вид:

$$\sigma = \eta \frac{d\varepsilon}{dt}$$

Также, как и модуль Юнга E , коэффициент вязкости η можно установить экспериментально, установив зависимость скорости деформации от прилагаемого усилия. Комбинация этих двух идеализированных моделей – абсолютно упругого тела и вязкой жидкости, – способна описать поведение значительного числа реальных материалов. К ним относятся и биологические ткани, причём, применение этих моделей имеет биологический смысл: упругие деформации позволяют силам распространяться по ткани, в то время как вязкие деформации предотвращают аккумуляцию значительных напряжений [17]. Поэтому модуль Юнга E и коэффициент вязкости η являются основными механическими параметрами в механобиологических исследованиях.

Наиболее ранней методикой измерения механических параметров ткани была микроаспирация – всасывание участка ткани эмбриона в полую прозрачную трубку. [15, 43]. Так как всасывание проводится при фиксированном давлении, а стенки трубки прозрачны, микроаспирация позволяет экспериментально установить зависимость деформации в исследуемом участке от давления в капилляре и на основании этой зависимости определить модуль упругости E и коэффициент вязкости η .

В дальнейшем, измерение механических свойств ткани стало возможным с помощью биосовместимых ферромагнитных микрокапель [44, 59]. Действие на такую микрокаплю магнитного поля заданной напряжённости \vec{H} приводит к её удлинению: изначально шарообразная капля меняет форму на эллипсоидальную. Зная напряжённость магнитного поля \vec{H} и механические свойства самой капли, можно рассчитать силу, с которой деформированная микрокапля действует на прилегающую ткань. Измерив возникающие при этом деформации в окружающих

тканях эмбриона, можно вычислить модуль Юнга и коэффициент вязкости исследуемой ткани.

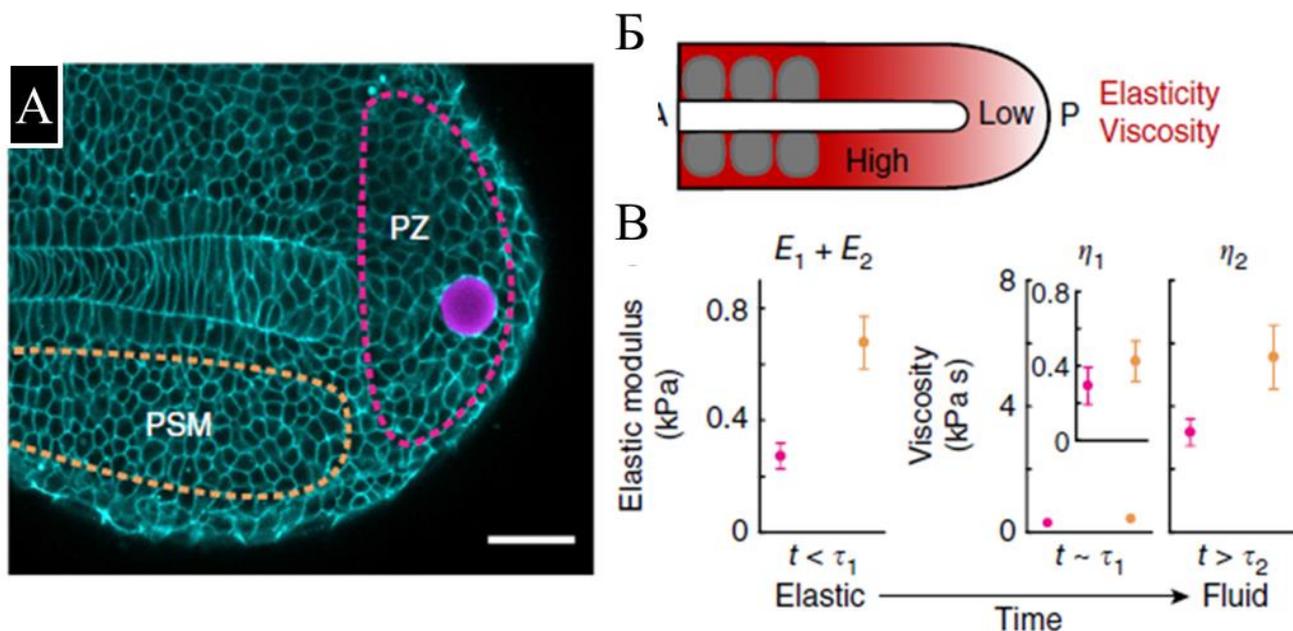


Рис. 2 Исследование механических свойств эмбриональных тканей в раннем развитии *Danio rerio*. (А) - конфокальные изображения, демонстрирующие ферромагнитную микрокаплю (сиреневый), попавшую в состав мезодермы хвостовой почки (PZ, розовая пунктирная линия), PSM – пресомитная мезодерма (оранжевая пунктирная линия), (Б) – схематическое изображение пространственных различий в механических свойствах тканей на стадии хвостовой почки: наиболее постериорные ткани характеризуются меньшей вязкостью и упругостью по сравнению с более антериорными, расположенными вблизи формирующихся сомитов, (В) – экспериментально установленные механические параметры (модуль упругости E и вязкость η) мезодермы хвостовой почки (розовый) и пресомитной мезодермы (оранжевый), вязкость η измерена для двух временных точек. (По [59], с изменениями).

Исследования с применением такого зонда продемонстрировали, что величина модуля упругости, равно, как и значение вязкости, оказались ниже в зоне мезодермы хвостовой почки развивающегося эмбриона (Рис. 2а, PZ, Рис. 2с, розовые маркеры) по сравнению с более антериорной областью пресомитной мезодермы (Рис. 2а, PSM, Рис. 2с, розовые маркеры) [59]. Так как этот метод определяет жёсткость ткани, он отражает возможность внутренних перегруппировок в ней. Чтобы понять клеточные механизмы, опосредующие подобную разницу в механических свойствах тканей, авторы предприняли

дополнительное исследование [44]. Для этого они оценили подвижность клеток в мезодерме хвостовой почки и пресомитной мезодерме. Клетки мезодермы хвостовой почки в 6 раз чаще меняли соседей, а флуктуация длины клеточных контактов между соседними клетками была гораздо более выражена. Такая повышенная частота клеточных перегруппировок в клетках мезодермы хвостовой сопровождалась сниженным уровнем межклеточной адгезии и большим размером межклеточного пространства по сравнению с пресомитной мезодермой. Авторам удалось достаточно элегантно продемонстрировать это с помощью линии, нокаутной по гену N-кадгерина. У этой нокаутной линии размеры межклеточных пространств оставались неизменными в мезодерме хвостовой почки, но увеличивались в пресомитной мезодерме по сравнению с диким типом. Это позволило авторам сделать вывод о меньшей интенсивности межклеточной адгезии в области мезодермы хвостовой почки, т.к. нокаут по N-кадгерину её практически не нарушал. Таким образом, большую жесткость ткани в области пресомитной мезодермы можно объяснить более выраженной N-кадгерин-зависимой адгезией и, как следствие, меньшей подвижностью клеток внутри ткани. При этом, в области мезодермы хвостовой почки менее выраженная межклеточная адгезия создает возможность для более интенсивных перегруппировок клеток, из-за чего ткань релаксирует возникающие в ней напряжения, подобно частицам в жидкости. Этот результат хорошо согласуется с данными о меньшей величине коэффициента вязкости η в области мезодермы хвостовой почки, так как в жидкости с меньшей вязкостью частицы более подвижны (Рис 1с, розовые маркеры).

Роль механических сил в регуляции движений клеток

Перечисленные в предыдущем разделе методики позволяют зарегистрировать механические силы в ткани и охарактеризовать пассивные реакции тканей на действие силы. Однако наблюдения свидетельствуют, что действие силы на ткань часто сопровождается перегруппировками клеток в её

составе [27]. Эти данные позволяют предположить в том числе, что механическая сила может влиять на подвижность клеток.

Экспериментальные свидетельства в пользу этого предположения, в частности, были представлены в ранее упомянутой работе Streichan с соавторами, описавших карты механических напряжений в тканях *D. melanogaster*. Авторы продемонстрировали, что смоделированные на основе этих карт движения клеток поверхностного слоя совпадают с реально зарегистрированными в эмбрионе (Рис. 3). Движения клеток, как и пространственное распределение миозина, характеризуются тремя хронологически последовательными паттернами [68]. Таким образом, стадийноспецифические паттерны механических напряжений с большой вероятностью позволяют предсказать морфогенетические движения в нормальном развитии.

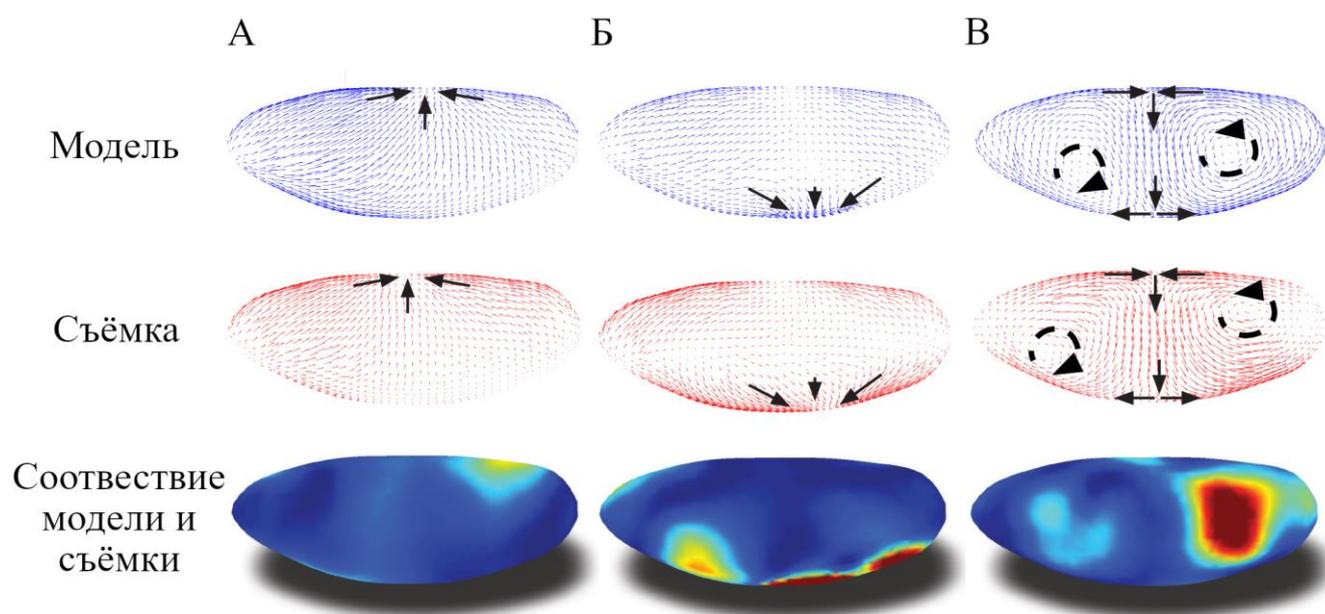


Рис. 3 Морфогенетические движения клеток бластодермы *D. melanogaster* на стадиях формирования головной борозды (А), формирования вентральной борозды (Б) и удлинения зародышевой полоски (В). Сверху вниз: поле движений клеток, смоделированное на основании реконструкции механических напряжений в ткани (синий), поле движений клеток, зарегистрированное в ходе прижизненной съёмки (красный) и соответствие между ними (синий цвет - наилучшее соответствие, красный - наихудшее). (По [68]).

Экспериментальное свидетельство влияния механических сил на движение клеток было получено Nara и коллегами на примере эксплантатов осевой

мезодермы и мезодермы ведущего края гастрюлы *X. laevis* [28]. В эксплантатах, содержащих одновременно осевую мезодерму и ведущий край мезодермы, клетки последнего при миграции генерировали силу величиной около 40 нН, оказывая тягу на расположенную постериорнее осевую мезодерму. Это подтверждает лазерное надсечение материала осевой мезодермы в области, расположенной на расстоянии нескольких клеточных диаметров постериорнее границы с ведущим краем мезодермы. Надсечение приводит к мгновенному расхождению краев надреза и более высоким деформациям в областях как непосредственно anteriорнее, так и постериорнее надреза. Если эксплантат не включает ведущий край мезодермы, амплитуда расхождения краёв разреза была меньше. Подавление миграции ведущего края мезодермы *in vivo* из-за нарушения формирования фибронектинового матрикса с помощью морфолино олигонуклеотидов, приводило к уменьшению длины и ширины клеток осевой мезодермы. Это сопровождалось нарушением медиолатеральной ориентации клеток, что приводило к нарушению конвергентного удлинения. Эти исследования согласуются с исследованиями на мезэнтодерме *X. laevis*, которые продемонстрировали, что локальное приложение механической силы через кадгериновые контакты инициирует формирование ламеллоподий на полюсе клетки, диаметрально противоположном точке приложения силы [74].

Наиболее ранние экспериментальные свидетельства влияния механических сил на движение клеток движений клеток получила группа Белоусова [6]. Многоэтапное растяжение эксплантатов крыши бластоцеля ранней гастрюлы *X. laevis* с помощью двух пар стеклянных игл в течение получаса инициировало движения клеток. Исследование траекторий движения клеток выявило два преимущественных направления миграции (Рис. 4). Первое направление миграции было параллельно оси растяжения и ориентировано в сторону места введения игл, т.е. точек приложения силы. Второе направление миграции было перпендикулярно оси растяжения и ориентировано к центральной линии эксплантата. Движение клеток во втором направлении плавно сменялось вдоль

медиолатеральной оси эксплантата движением в первом направлении [4, 84]. Такая картина движений клеток напоминает паттерн движения клеток при конвергентном удлинении нервной пластинки, наблюдаемый как в эксплантатах глубоких клеток нервной пластинки и подлежащей мезодермы, так и в интактных эмбрионах *X. laevis* [23, 37]. В частности, движение клеток крыши бластоцеля в первом направлении в экспериментах Белоусова и Трошиной напоминает движение потока клеток презумптивной нервной пластинки, в антерио-постериорном направлении. При этом движение клеток во втором направлении напоминает конвергенцию клеток к центральной линии нервной пластинки. Растяжение эксплантатов на эластичной подложке также инициировало конвергенцию клеток в направлении, перпендикулярном направлению растяжения. Сразу по завершении растяжения возникающие ламеллоподии были сонаправлены оси растяжения, но в течение примерно 15 минут формировались ламеллоподии, ориентированные перпендикулярно оси растяжения. В течение нескольких часов после начала растяжения движения конвергенции приводили к изменению формы эксплантата на характерную гантелевидную форму [6].

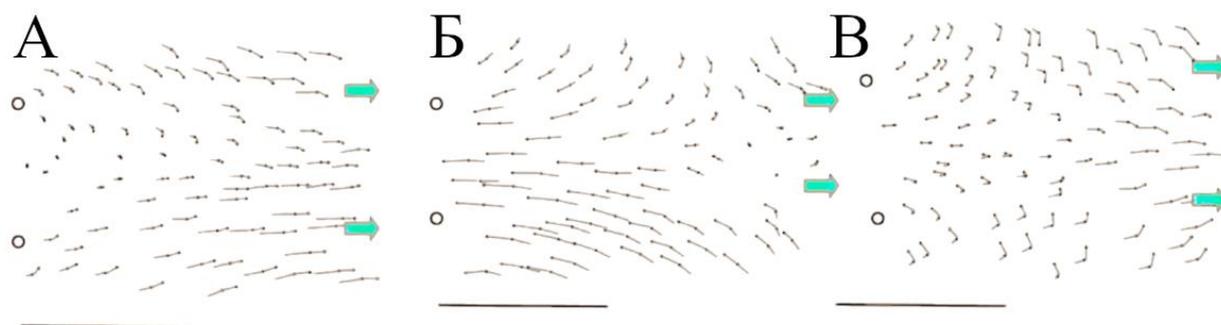


Рис. 4 Векторы движений клеток эпизктодермы для трёх растянутых эксплантатов крыши бластоцеля *X. laevis*. Стрелки - направление растяжения, окружности - положение неподвижных игл. Масштабные отрезки – 500 мкм (по [84]).

Молекулярные механизмы реакции клеток на механические силы.

Таким образом, клетки различной природы оказываются способны реагировать на механические силы, в том числе и эндогенные. В частности,

эксплантаты крыши бластоцеля в опытах Белоусова образованы двумя морфологически отличными типами клеток: слоем эпителиальным клеток – эпизктодермой и несколькими слоями более мезенхимальных глубинных клеток гипозктодермы [6, 36].

Ключевой функцией эпителиальных тканей является создание барьера между организмом (или его отдельным компартментом) и внешней средой. В связи с этим, основными отличительными морфологическими чертами эпителиев является выраженная апико-базальная полярность, а также механическая связность клеток через апикальный комплекс клеточных контактов, включающий адгезионные (*zonula adherens*) и плотные контакты (*zonula occludens*) [32]. В связи с этим любые клеточные перегруппировки в эпителиях предполагают достаточно нетривиальный механизм.

Мезенхимальные ткани характеризуются большей подвижностью в связи с меньшей механической связностью клеток в ткани и более лабильной морфологией. В частности, мезенхимальные клетки не имеют выраженной апико-базальной полярности и более активно образуют клеточные выросты. При этом морфологическая характеристика обоих типов тканей лабильна, и они способны при определённых условиях трансформироваться друг в друга. В экспериментах, которые можно считать аналогом экстирпации эпителиального слоя, клетки последнего способны частично утрачивать некоторые признаки эпителиальности (в частности - интернализировать E-кадгерин) [58]. Аналогично, мезенхимальные клетки (и глубинные клетки гипозктодермы *X. laevis*, в частности) способны в течение нескольких часов эпителизоваться, с формированием специфической для эпителиев апикальной сети кератиновых промежуточных филамент, а также аккумуляцией ZO-1 в апикальной области [39].

Оба этих типа клеток способны осуществлять движения медиолатеральной интеркаляции. Этим термином обозначают класс клеточных движений, приводящий к осевому вытяжению ткани за счёт вставлению клеток между друг между другом в плоскости пласта [65]. На данный момент предложено две

модели, описывающие клеточный механизм медиолатеральной интеркаляции [60].

Механизм, именуемый ССТ (англ. *cell-on-cell traction*), наиболее исследован на примере медиолатеральной интеркаляции в презумптивной осевой мезодерме *X. laevis*. Каждая из клеток удлиняется вдоль медиолатеральной оси и формирует на концах направленные выросты, которые образуют С-кадгериновые контакты с телами соседних клеток. Эти клеточные выросты обогащены актином и схожи с ламеллоподиями мигрирующих клеток [40]. Внутри клетки актиновая сеть представлена системой тонких, прямых фибрилл, которые при пересечении формируют узловые комплексы (в английской терминологии – «node»). Такие комплексы не статичны, и динамично перемещаются вдоль длинной оси клетки. Актиновую сеть с такой организацией называют NCN («node-and-cable network»). NCN нескольких клеток объединяются в единую сеть через С-кадгериновые контакты. Затем, за счёт как *cell crawling*, так и сократительной активности NCN, клетка оказывает тягу на соседние клетки, с которыми она образовала контакты. В результате, последние вставляются друг между другом вдоль медиолатеральной оси [52, 64].

На стадиях, предшествующих движениям интеркаляции, клетки осевой мезодермы характеризуются изодиаметрической формой, а образуемые клеточные выросты не ориентированы относительно осей эмбриона. В дальнейшем, морфология клеток становится биполярной а клеточные выросты формируются преимущественно в медиолатеральном направлении [52]. Ограничение области формирования выростов латеральными поверхностями сопровождается мембранной локализацией белка *Xdsh*, ключевого компонента RCP-каскада. Такие изменения в морфологии клеток указывают на то, что для успешного протекания движений интеркаляции формируемые клеткой выросты должны локализоваться строго на латеральных поверхностях и существовать достаточное время, чтобы образовать контакт с телом соседней клетки. Нарушение одного из этих условий приводит к нарушению конвергентной

интеркаляции. Экспериментально это продемонстрировали Wallingford с соавторами, показав, что как оверэкспрессия *Xdsh*, приводящая к образованию стабильных выростов, но в эктопических участках, так и экспрессия мутантной формы *Dsh*, *Xdd1*, вследствие которой клетки не могут поддерживать стабильность выростов достаточно время, нарушают движения конвергентной интеркаляции [71].

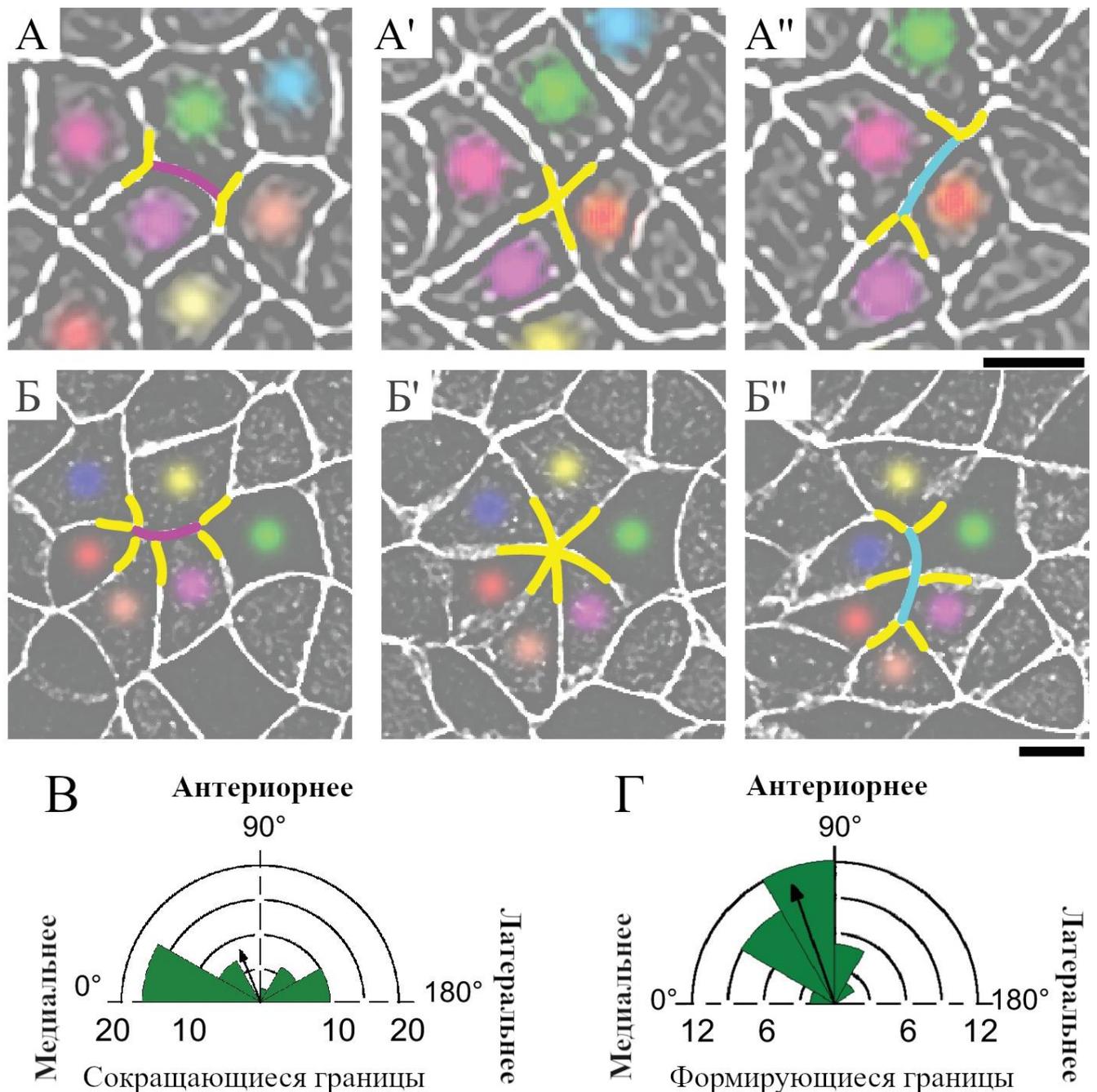


Рис. 5 Медиолатеральная интеркаляции в эпителиальных пластах происходит за счёт Т-перехода. (А - А'') Т-переход в эпителии нервной пластинки *X. laevis*, маркирование мембранным GFP. При Т-переходе происходит сокращение общей

границы контактирующих клеток тетрады, т.н. v-границы (пурпурная линия), в медиолатеральном направлении (T1-T2 переход, А). После окончательного сокращения v-границы (А') происходит формирование новой, т.н. t-границы (голубая линия) в перпендикулярном направлении, т.е. вдоль переднезадней оси эмбриона (T2-T3 переход, А''). Масштабный отрезок 20 мкм. (Б - Б'') Если в T-переход вовлечено более 4х клеток, говорят о формировании клеточной розетки. В этом случае происходит одновременное сокращение нескольких v-границ (пурпурный цвет), что приводит к образованию характерной морфологической структуры, называемой «клеточной розеткой» (Б'). T-границы (голубой цвет), возникающие при распаде розетки, также оказываются ориентированы вдоль переднезадней оси эмбриона (Б''). Масштабный отрезок 20 мкм. (В) Ориентация v-границ при формировании многоклеточных розеток, стрелка - средний результирующий вектор. (Г) Ориентация t-границ при распаде многоклеточных розеток, стрелка - средний результирующий вектор. (По [73]).

Конвергентная интеркаляция также может осуществляться за счёт механизма сокращения границ, также называемого T1-переходом (Рис. 5). Последний термин используют две конфликтующие номенклатуры. В первой, предложенной Weaire и Rivier, термином «T1-процесс» описывают полный цикл интеркаляционных движений, а термины «T2-процесс» и «T3-процесс» соответствуют вытеснению клетки из состава пласта и клеточному делению соответственно [73]. Во второй номенклатуре, предложенной в работе Bertet и соавторов, T1, T2 и T3 (от англ. «type») обозначают три последовательных конфигурации клеточных контактов, составляющих полный цикл интеркаляционных движений [7]. Переход от одной конфигурации к последующей называют, соответственно, T1-T2 и T2-T3-переходом. В дальнейшем, в данном тексте термин «T-переход» без числового индекса будет соответствовать «T1-процессу» в номенклатуре Weaire и Rivier, а термины «T1-T2-переход» и «T2-T3-переход» будут соответствовать номенклатуре Bertet и соавторов.

Изначально, этот тип интеркаляции был описан для зародышевой полоски *D. melanogaster* [9] и считался характерным, в основном, для эпителиальных тканей. Однако интеркаляция по данному механизму была продемонстрирована и для мезенхимальных клеток [51, 62, 70, 75]. Минимально в такой тип интеркаляции вовлечено 4 клетки: 2 из них – антериорная и постериорная клетки

квартета, – находятся в прямом контакте друг с другом, т.е. имеют общую границу, отделяющую постериорный полюс одной из контактирующих от антериорного полюса соседней, т.н. v-границу, от англ. «vertical junctions» (такое название связано с тем, что в исходной работе [54], выполненной на эмбрионе *D. melanogaster*, антеропостериорная ось эмбриона совпадала с горизонтальной осью изображений, в связи с чем медиолатерально ориентированные границы клеток оказывались сонаправлены вертикальной оси изображения). Оставшиеся 2 клетки, (медиальная и латеральная), оказываются разделены и отстоят друг от друга на длину v-границы [55]. Т-переход подразделяют на две хронологически последовательные фазы: Т1-Т2 и Т2-Т3. В ходе Т1-Т2 перехода контактирующие клетки тетрады сокращают общую клеточную границу (Рис. 5 А'). Затем, в ходе последующего Т2-Т3 перехода происходит формирование в зоне контакта новой границы (т.н. t-границы), ориентированной в антерио-постериорном направлении, т.е. перпендикулярно изначальной v-границе (Рис. 5 А''). Т.о. образом, первоначально отделённые друг от друга клетки приходят в контакт, сближаясь вдоль медиолатеральной оси [11].

Сокращение v-границ при Т1-Т2 переходе происходит за счёт актомиозиновой активности, которая создает локальное напряжение, сближая t-границы. Оно также обеспечивает необратимость Т1-Т2 перехода, предотвращая формирование новой клеточной границы в медиолатеральном направлении. Отличительной особенностью ремоделирования сократительного комплекса при Т-переходе является периодический характер аккумуляирования и последующего сокращения актомиозинового комплекса. На цейтраферной съёмке процесса сокращения v-границ с использованием F-актина или миозина II, конъюгированных с флуоресцентным белком, интенсивность их флуоресценции в области v-границ колеблется с определённой периодичностью. Поэтому аккумуляирование как миозина, так и актина характеризуют как пульсационное, или осциллирующее [11].

Специфическая локализация актомиозинового комплекса при механизме сокращения границ не обеспечивается универсальным механизмом и может различаться у разных видов. У *X. laevis* такая анизотропная локализация актомиозинового комплекса является RCP-зависимой. Как в эпителии нервной пластинки, так и в клетках мезодермы, ключевой белок каскада планарной полярности, Prickle2 (в нейральной эпителии – вместе с Vangl2) избирательно ассоциирован с ν -границами, находящимися в фазе сокращения. В зависимости от конкретной ткани роль Prickle2 в contraction mode может несколько варьироваться. В нейральной эпителии экспрессия доминант-негативной формы Prickle2 (Pk2- Δ PDL) нарушает накопление миозина II в области ν -границ, а пространственная локализация Prickle2 имеет пульсационную динамику, коррелирующую с динамикой одной из изоформ легкой цепи миозина, Myl9 [11]. Таким образом, в данном типе ткани Prickle 2 может играть важную роль в стратификации актомиозинового комплекса. Аналогичная пульсационная динамика наблюдается и в мезодермальных клетках. Осцилляция F-актина инициируется в толще клетки в области сокращающейся границы, и затем смещается в кортикальный пул. Пульсации F-актина коррелируют с пульсациями Prickle2. Подавление активности Prickle2 влияет на частоту осцилляций актомиозинового комплекса, снижая её практически в два раза [61, 62].

Vangl2 выступает потенциальной мишенью, через который механические силы способны влиять на движения клеток, так как он демонстрирует механозависимую локализацию. При экстирпации эктодермы *X. laevis*, до гаструляции, стабильные комплексы Vangl2 и Fzd3 формируются с задержкой: их количество в эксплантатах, вырезанных на стадии 12 соответствует количеству стабильных комплексов в интактных эмбрионах на стадии 10, а в эксплантатах, вырезанных на стадии 20 – количеству стабильных комплексов в контроле на стадии 12. Однако искусственная деформация эксплантатов привела к формированию выраженной оси планарной полярности в то же время, что и у контрольных эмбрионов. Новая планарная ось маркировалась ориентацией

апикальных микротрубочек и появлением зон контактов, содержащих повышенный уровень стабильных комплексов Fdz3-GFP. Воздействие нокодазолом предотвращало поляризованное распределение комплексов Fdz3 как при искусственной деформации, так и без. Эти данные позволяют предположить, что деформация эктодермы вызывает поляризацию апикальных микротрубочек, которые в дальнейшем способствуют полярному распределению стабильных комплексов РСР.

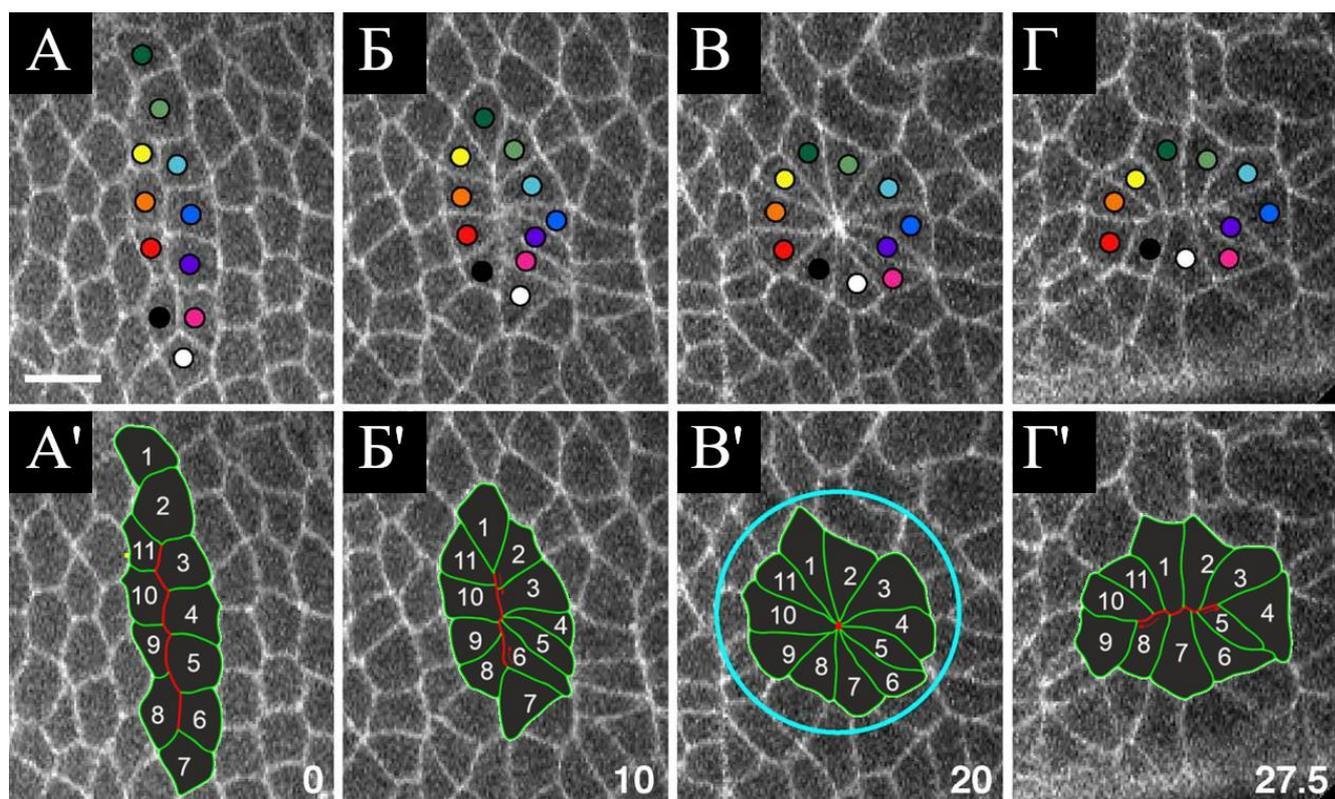


Рис. 6 Схема формирования и распада клеточной розетки в ходе удлинения зародышевой полоски *D. melanogaster* (на основе [9], с изменениями). При инициации формирования розетки (А, А') каждая клетка внутри клеточного тяжа сокращает свою границу, которой она контактирует с клетками из соседнего тяжа. (Б; Б', пунктирные красные стрелки) Формирование розетки заканчивается, когда граница контакта между клетками двух тяжей сходятся в точку (В; В', красная точка) В ходе распада розетки образующий домен клеток группируется в два новых тяжа, перпендикулярных ориентации первоначальных тяжей (Г; Г', пунктирные красные стрелки). Нижний ряд: красная линия – граница контакта между клетками двух тяжей, пунктирные красные стрелки – направление сокращения/формирования границы между клетками двух тяжей, красная точка – центр розетки, числа – время в минутах, масштабный отрезок – 10 мкм.

Процесс T2-T3 перехода исследован в гораздо меньшей мере. Однако, недавнее исследование продемонстрировало, что эктопическое растяжение способно в значительной (в 2,1 раза) увеличивает скорость формирования границы в направлении растяжения. Эктопического растяжения удалось добиться, инициировав фотоповреждение антериорной и постериорной клеток тетрады ультрафиолетовым лазером. Воздействие лазера приводило к аккумуляции миозина на апикальной поверхности клеток и их последующему апикальному сокращению, которое растягивало участок ткани между ними [77].

В случае, если в T-переход вовлечено более 4х клеток, то говорят о перестройке через формирование розетки (Рис. 5Б-Б'', Рис. 6). В этом случае происходит сокращения общих границ внутри группы клеток, выстроенных в два параллельных тяжа (Рис. 6А, А'). Каждая клетка внутри данной пары клеточных тяжей сокращает свою границу, которой она контактирует с клетками из соседнего тяжа так (Рис. 6Б, Б'), что на оптическом срезе граница контакта между клетками двух тяжей сходятся в точку (Рис. 6В, В'). На кадре съемки такая точка возникает из-за прохождения оптического среза через общую границу для всех клеток розетки (сонаправленную апикобазальной оси). Затем клетки розетки группируются в два новых тяжа, перпендикулярных ориентации первоначальных тяжей (Рис. 6Г, Г').

Описаны как минимум два основных типа формирования розеток, отличающихся по характеру распределения сигнальных комплексов и сократительного аппарата клетки [29]. В первом случае, F-актин, миозин II и ряд белков, (ключевыми среди которых являются Par-белки и белки клеточных контактов) колоколизуются в апикальном домене клетки, а процесс формирования розетки сводится к апикальному сокращению образующих её клеток. Во втором случае актомиозиновый комплекс и сигнальные молекулы оказываются распределены вдоль взаимноперпендикулярных осей. Как правило, F-актин и миозин II локализованы на медиальных поверхностях клеток, вдоль антеропостериорной оси эмбриона, в то время как Par-белки и белки клеточных

контактов локализируются на антериорной или постериорной поверхностях клеток, вдоль медиолатеральной оси эмбриона. Кроме того, F-актин и миозин II не концентрируются в апикальном домене, а распределяются вдоль апикобазальной оси. Эти два типа розеток также отличаются временем существования. Розетки первого типа могут существовать продолжительное время, в то время как розетки второго типа быстро перестраиваются. Как правило, процессы, связанные с вытяжением ткани сопровождаются перестроением именно розеток второго типа.

Описанные выше процессы зарегистрированы, в основном, в апикальном компартменте клеток. На примере удлинения зародышевой полоски у эмбриона *D. melanogaster* было продемонстрировано, что и базолатеральная часть эпителиальных клеток может быть активно вовлечена в T-переход. В ходе преобразования розеток клетки бластодермы, лежащие вдоль дорсовентральной оси формируют в базолатеральном компартменте обогащенные актином клиновидные выросты в направлении центра розетки. Эти выросты приходят в контакт в центре розетки, и, в результате, формируется т.н. базолатеральные розетки. Затем клетки осуществляют миграцию навстречу друг другу, что переводит к перестроению базолатеральные розетки. Формирование выростов осуществляется по Rac1-зависимому механизму, т.е. аналогично формированию ламеллоподий в мигрирующих клетках. При этом тирозин киназа Src42A выступает регулятором более высокого уровня в этом процессе. Базолатеральные розетки примерно в 70% случаев хронологически предшествуют апикальным. Считается, что апикальные и базолатеральные розетки функционируют независимо от друг от друга, однако, это утверждение требует дополнительной экспериментальной проверки [69]. Аналогичный механизм, предположительно, может функционировать и в случае клеток эпизктодермы *X. laevis* на стадии гастрюлы, так как они также формируют базолатеральные клеточные выросты [35, 36].

Достоверно оценить, насколько отличаются по величине силы, создаваемые при каждом из типов интеркаляции, затруднительно. В случае у *X. laevis*

презумптивные нейральная эктодермы и осевой мезодерма сопряжены не только, механически, но и сигнально, что ограничивает объективность методов, основанных на экстирпации фрагментов ткани.

Силы, развиваемые при конвергенции мезодермальных тканей, были измерены количественно. Конвергирующая мезодерма двойных эксплантатов супрабластопоральной области увеличивает свою жёсткость в 3-4 раза в направлении оси вытяжения, генерируя при этом силу порядка 0,5 мН. Таким образом, мезодермальные ткани однозначно способны создавать толкающее усилие для преодоления сопротивления окружающих тканей в ходе конвергентного удлинения [45]. Вклад эпителиальных тканей в генерирование сил при конвергентной интеркаляции оценён только качественно. Двойные эксплантаты супрабластопоральной области, в которых эпителиальный слой был заменён на эпителий анимальной шапочки, клетки которого в норме не вовлекаются в движения конвергентной интеркаляции, тем не менее, демонстрировали конвергентное удлинение, хотя и в меньшей мере, чем интактные эксплантаты. Такое же поведение наблюдали и у эксплантатов, где нативный эпителий был заменён трансплантат из аналогичного региона эмбриона. При этом, при полной экстирпации эпителия конвергентное удлинение в эксплантатах нарушалось, и таким образом, полноценное протекание конвергентной интеркаляции требуют присутствия эпителия в той или иной форме [33]. Вместе эти факты свидетельствуют в пользу того, что, хотя мезодермальные клетки способны генерировать силу, достаточную для осуществления движений конвергентной интеркаляции, это, однако не исключает, что эпителий способен генерировать силу при совместном осуществлении медиолатеральной интеркаляции с глубокими клетками.

Материалы и методы

Материалы

1.1 Реактивы.

Фибронектин человека, стерильный (ООО «Имтек», Россия)

1.2 Ферментные препараты

РНК-полимераза SP6, HC (Thermo Scientific, США), эндонуклеазы рестрикции CsinI, KpnI (НПО "СибЭнзим", Россия),

1.3. Лабораторное оборудование

В работе использовали настольную центрифугу Minispin plus (Eppendorf, Германия), шейкер с термостатируемой камерой Environmental Shaker-Incubator ES-20 (BioSan, Россия), инкубатор Binder KB 23 (Binder, Германия), УФ-трансиллюминатор (Vilber Lourmat, Франция), весы аналитические Adventurer» (Ohaus, Китай), микроинъектор Nanoject II (Drummond Scientific Company, США), эпифлуоресцентный микроскоп Olympus SZX9 с флуоресцентным блоком U-RFL-T (Olympus Europe, Германия), лазерный сканирующий конфокальный микроскоп Olympus FV10i, лазерный сканирующий конфокальный микроскоп Zeiss LSM880 (Carl Zeiss, Германия),

1.4. Оборудование для искусственной деформации эксплантатов эмбриональной ткани X. laevis

Установка для высокоточного одноосевого растяжения эластичных клеточных подложек (патент RU2723726C1, изготовлено на заказ ООО «Троицкий инженерный центр», Россия), блока управления (изготовлено ООО «Троицкий инженерный центр», Россия).

1.5 Лабораторные животные

Для получения эмбрионов в работе использовали самцов и самок африканской шпорцевой лягушки (*Xenopus laevis*, Daudin), содержащихся в

аквариальной комнате кафедры эмбриологии Биологического факультета МГУ и аквариальной комнате ИБР РАН.

1.6 Буферы и растворы

Раствор MMR (модифицированный раствор Рингера для культивации зародышей амфибий): 0,1 М NaCl, 2 мМ KCl, 2 мМ CaCl₂, 1 мМ MgSO₄, 5 мМ HEPES, pH 7,4

2% водный раствор L-цистеина, pH 8,0

3% раствор фикола в 30% MMR

SEBuffer для эндонуклеаз рестрикции (НПО "СибЭнзим", Россия)

50X TAE (50-кратный буфер для электрофореза в агарозном геле): 2М Tris-HCl, 1,56 М уксусная кислота, 50 мМ EDTA.

Раствор бромистого этидия в воде для окрашивания ДНК в агарозных гелях

2

мкг/мл.

1.7 Микробиологические среды

Среда LB

Смесь среды LB и агара (с концентрацией 1,5%).

1.8 Плазмиды

Плазмиды pCS2+/GAP43-GFP и pCS2+/H₂B-mCherry любезно предоставил доктор Dietmar Gradl (Karlsruhe Institute of Technology, Karlsruhe). Плазмиду pCS2+/LifeAct любезно предоставил Виталий Владиславович Козин.

Методы

Получение эмбрионов

Эмбрионы *X. laevis* получали оплодотворением *in vitro* согласно стандартному протоколу [63]. Для получения ооцитов у самок *X. laevis* стимулировали овуляцию инъекцией водного раствора человеческого хорионического гонадотропина в спинной лимфатический мешок. Каждой особи инъецировали от 550 до 650 мкл раствора с концентрацией гонадотропина 1000

ед/мл. Через 11-12 часов ооциты аккуратно выдавливали из самки в сухие чашки Петри. Для оплодотворения икры у самца вырезали семенник, затем фрагмент семенника гомогенизировали с помощью ножниц. Получившийся гомогенат сразу смешивали с 0,5-0,75 мл 1x MMR для растворения гомогената, после – с 0,5-0,75 мл 0,1x MMR для активации сперматозоидов, а затем переносили получившуюся суспензию в чашки с икрой. Икру тщательно перемешивали с суспензией в течение 1-2 минут, затем наполняли чашку 0,1x MMR.

Через 30-45 мин удаляли студенистые оболочки, инкубируя икру в 2% раствором L-цистеина. После инкубации в цистеине эмбрионы промывали 4-5 раз 0,1x MMR и культивировали в 0,1x MMR до необходимой стадии.

Инъекция РНК

Для визуализации клеточных границ осуществляли инъекцию мРНК мембранного (GAP43-GFP) и ядерного (H2B-mCherry) маркёров.

мРНК синтезировали с имеющихся в лаборатории плазмид pCS2+/GAP43-GFP и pCS2+/H2B-mCherry, которые любезно предоставил доктор Dietmar Gradl (Karlsruhe Institute of Technology, Karlsruhe). Выделение целевых плазмид после амплификации осуществляли с помощью набора Plasmid Miniprep (Evrogen), синтез РНК – с помощью набора mMESSAGING mMACHINE™ SP6 Transcription (Invitrogen), согласно предоставленному производителем протоколу.

Эмбрионы на стадиях от 2х до 4х бластомеров переносили из 0,1 MMR в раствор фикола на 0,3 MMR и осуществляли инъекцию мембранного (РНК GAP43-GFP) и ядерного (РНК H2B-mCherry) маркёров общим количеством от 230 до 460 пг в случае GAP43-GFP и от 230 до 460 пг в случае H2B- mCherry. Инъекцию производили в каждый двух анимальных бластомеров, в бывшую область серого серпа, суммарный объём инъекции составлял 4,6 или 9,2 нл. После инъекции зародышей оставляли в растворе фикола на 0,3 MMR и помещали в термостат с температурой 14°C -15°C для предотвращения образования протрузий в местах инъекции. Через 7-8 часов раствор фикола меняли на 0,1 MMR, после чего продолжали культивирование при температуре 14°C - 15°C до достижения эмбрионами стадии 10-10½ согласно таблицам нормального развития [50].

Микрохирургические операции

В ходе микрохирургических операций проводили вырезание фрагментов эмбриональной ткани для экспериментов по искусственной деформации. Операции осуществляли на стадиях 10-10½ [50]. Перед началом операции студенистую оболочку снимали 2.5% раствором цистеина, желточную оболочку снимали пинцетами вручную. Затем, эмбрионов переносили в чашку Петри, заполненную 1x MMR, где с помощью микрохирургического ножа и стеклянной палочки вырезали выбранный фрагмент ткани. Получившиеся эксплантаты переносили в заранее подготовленные инкубационные камеры (см. раздел «Искусственная деформация эксплантатов») с помощью пластиковой пипетки.

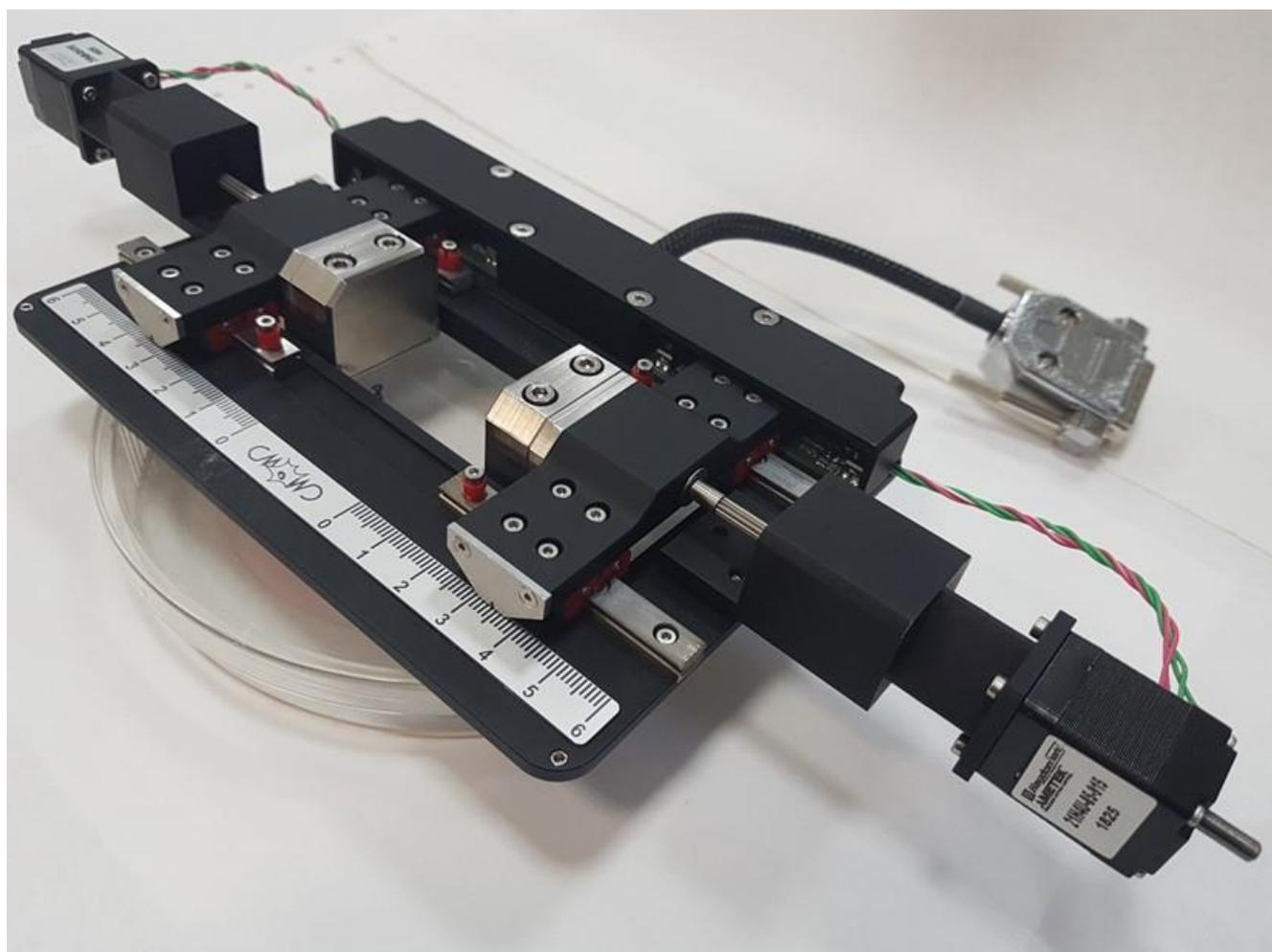


Рис. 7 Общий вид установки для высокоточного одноосевого растяжения эластичных клеточных подложек.

В случае крыши бластоцеля, выбранный фрагмент состоял из эпителиального слоя клеток эпизктодермы и из подстилающих его нескольких слоев более мезенхимальных клеток гипоектодермы.

Окрашивание на F-актин

Эксплантаты и интактные зародыши различных сроков фиксировались в растворе 3,7% формальдегида (Sigma), приготовленном на фосфатном буфере (PBS). После фиксации образцы 30 мин промывались PBS и помещались в раствор PBS-T (TritonX100 5 мкл/мл на PBS). Окрашивание проводили в течение 45 мин раствором Rhodamine-phalloidin (0,005 мг/мл в PBS-T) в темноте, после чего образцы отмывали в течение 2 ч и помещались в заливочную среду (смесь глицерина и PBS в соотношении 4:1).

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 RU2723726C1, изготовлено ООО «Троицкий инженерный центр», Россия) (Рис. 7).

В качестве эластичного субстрата использовали инкубационные камеры из прозрачного эластомера, дно которых представляет собой ультратонкую подложку (толщина подложки составляет 100-200 мкм). Использовали два типа камер: коммерческие инкубационные камеры производства STREX (STREX Inc., США) с растяжения до 20%, и самодельные камеры, изготовленные непосредственно в лаборатории. Для изготовления камер в лаборатории, вырезали фрагмент сверхтонкой эластичной плёнки Gel-Pak PF-40-X0 с необходимыми геометрическими размерами, снимали защитный слой и с помощью пинцета переносили плёнку в пластиковую чашку Петри с 70% этанолом, после чего

инкубировали в течение 20 минут на качалке для удаления остатков липкого основания защитного слоя. Затем плёнку переносили в сухую крышку чашки Петри и сушили под ламинаром. После полного высыхания спирта на плёнку устанавливали бортики из PDMS и герметизировали соединение между бортиками и плёнкой с помощью силиконовой смазки (Dow Corning High Vacuum Grease). Чтобы обеспечить адгезию эксплантатов ко дну камер, на него наносили адгезионное покрытие из фибронектина человека (ООО «Имтек», Россия). Для нанесения покрытия как коммерческие, так и самостоятельно изготовленные камеры перед экспериментом подвергали предварительной обработке. Сначала камеру помещали в чашку Петри, заполняли 70% этанолом и инкубировали в течение 20 минут на качалке для обеззараживания поверхности. Затем удаляли спирт и сушили камеру внутри ламинара. После полного высыхания спирта дно камеры облучали под УФ-лампой ламинара на расстоянии 3 см от лампы в течение 30-45 минут, чтобы сделать изначально гидрофобный материал камеры более гидрофильным и увеличить его сродство к фибронектину [1, 26]. Немедленно после облучения наносили адгезионное покрытие. Для этого внутрь камеры вносили 1 мл фибронектина человека с концентрацией 1 мг/мл и оставляли инкубироваться на ночь при +4°C [16, 53]. На следующий день удаляли раствор фибронектина, заливали в инкубационную камеру 2мл 1x MMR и монтировали её в изготовленную на заказ установку для высокоточного одноосевого растяжения. Перед внесением эксплантатов инкубационную камеру прерастягивали на 0,5 мм, чтобы минимизировать провисание дна.

После подготовки инкубационной камеры вырезали фрагменты крыши бластоцеля эмбрионов *X. laevis* на стадии 10-10 ½ (см. раздел «Микрохирургические операции») [50]. Эксплантаты крыши помещали в инкубационную камеру гипоектодермой на субстрат, аккуратно прижимали покровным стеклом на силиконовых ножках, после чего инкубировали в течение двух часов для стимуляции адгезии эксплантатов к матриксу. После двух часов инкубации снимали покровное стекло и аккуратно монтировали установку для

растяжения с закреплённой в ней инкубационной камерой на предметный столик лазерного сканирующего конфокального микроскопа Zeiss LSM-800 (Рис. 8).

Процессом растяжения управляли с помощью свободно распространяемого ПО «SMC Program» (НПФ «Электропривод», Россия) ПК, через изготовленный на заказ блок управления (ООО «Троицкий инженерный центр», Россия). После растяжения осуществляли цейтраферную съёмку в течение 1 часа.

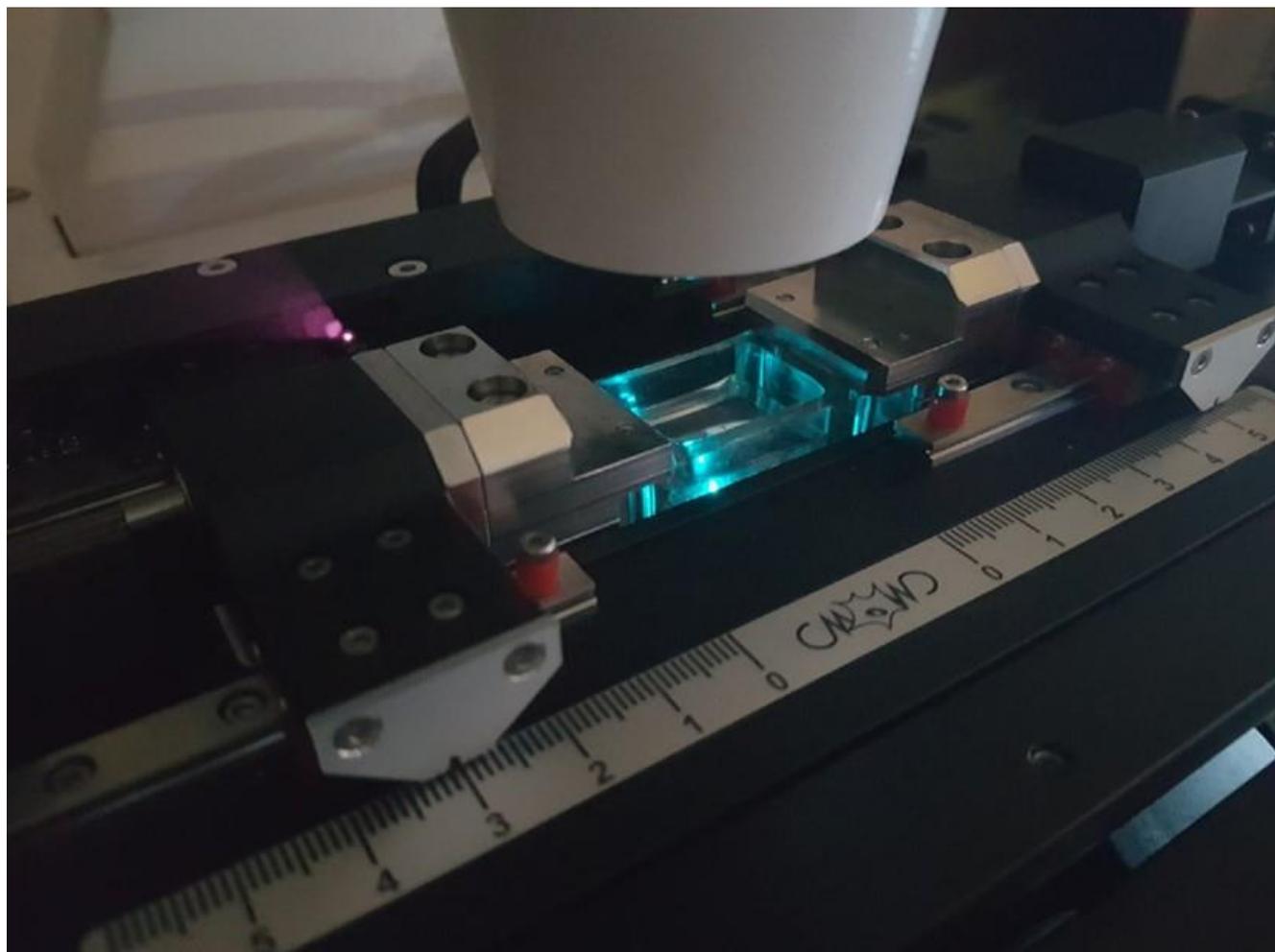


Рис. 8 Установка для высокоточного одноосевого растяжения эластичных клеточных подложек под конфокальным микроскопом Zeiss LSM880.

Конфокальная микроскопия

Для регистрации движений клеток в интактных эмбрионах, раннюю или среднюю гаструлу *X.laevis* (стадия $10\frac{1}{4}$ - $10\frac{1}{2}$), [50] переносили в 1x MMR, снимали желточные оболочки с помощью двух металлических пинцетов и оставляли на 5 минут для компенсации стресса от снятия оболочек. По

прошествии 5 минут зародышей вносили в 35 мм чашки Петри с дном из покровного стекла, заполненные 1% агарозой с низкой температурой плавления на 1х ММР. Зародышей ориентировали запаянной стеклянной пипеткой Пастера внутри сделанных в агарозе лунок так, чтобы медиальный участок супрабластопоральной области каждого эмбриона оказался вблизи покровного стекла, после чего чашку вносили в лазерный сканирующий конфокальный микроскоп Olympus FV-10i и осуществляли цейтраферную микрофотосъемку. Для съёмки использовали 10× 0,4 NA объектив UPLSAP и цифровое увеличение ×1.8 (суммарное увеличение т. о. составило ×18). Съёмку производили в течение часа с частотой 1 кадр/сек при интенсивности обоих лазеров 30%. 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 880. До искусственной деформации эксплантаты фотографировали, регистрируя сигнал по трём каналам: два флуоресцентных (для регистрации сигнала от мембранного и ядерного маркёров) и один для проходящего света (для регистрации формы эксплантатов). Сразу после инкубационную камеру растягивали на 20% в одном из выбранных режимов (5, 10 и 20 минут). Во всех режимах оставались постоянными следующие параметры: шаг растяжения - 3 мкм, дробление шага - 1/8 (повышает плавность растяжения).

Морфометрический анализ

Распознавание клеточных границ на кадрах цейтраферной съёмки осуществляли с помощью свободно распространяемого программного обеспечения EriTools 2.1.6. [30]. Для морфометрического анализа распознанные границы экспортировали в программу ICY bioimaging platform 2.0.0.0 где, при необходимости, перед морфометрическим анализом результаты распознавания клеточных границ корректировали вручную с помощью плагина CellEditor в

составе EpiTools 2.1.6. Данные морфометрического анализа экспортировали через соответствующую опцию плагина CellOverlay в составе EpiTools 2.1.6.

Для оценки смещений с помощью модуля CELL_OUTLINE в составе ПО EpiTools 2.1.6. получали координаты геометрического центра апикальной поверхности для каждой клетки в кадре и экспортировали полученные значения в Microsoft Excel 365:

1) Смещение рассчитывали, как кратчайшее расстояние между геометрическим центром клетки на двух последовательных кадрах. Для этого вычисляли отдельно разность координат X (ΔX) и разность координат Y (ΔY) центра масс клетки между двумя последовательными кадрами, после чего находили смещение D как корень из суммы квадратов ΔX и ΔY (т.к. смещение D и его компоненты ΔX и ΔY образуют прямоугольный треугольник, где S – гипотенуза, а ΔX и ΔY – катеты). Так временной промежуток между кадрами составляет 1 мин, рассчитанное перемещение D, фактически, представляет собой среднюю скорость смещения клетки с размерностью S мкм/мин.

2) Для вычисления угла α (принимает значения от 0° до 360°) между вектором смещения клеток и антерио-постериорной осью (совпадает с осью 0° - 180° , где 0° соответствует постериорному полюсу, а 180° – антериорному) сначала находили тангенс угла смещения $\text{tg}(\alpha) = \Delta X / \Delta Y$, после чего с помощью функции арктангенс (ATAN) находили величину угла смещения в градусах.

3) Сонаправленность смещений клеток оценивали с помощью параметра порядка $S = \langle \cos(\alpha) \rangle$, где α – угол между направлением смещения отдельной клетки и антерио-постериорной осью эмбриона (α принимает значения от 0° до 360°), $\langle \rangle$ – усреднение по нескольким значениям. Использование функции cos вместо непосредственного значения угла позволяет одновременно оценить как параллельность траектории смещения клетки антерио-постериорной оси (по модулю значения cos), так

и направление смещения клетки (по знаку величины \cos): 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 $\cos(180^\circ) = -1$ [38, 56].

4) Форму клеток оценивали через эксцентриситет — числовую характеристику конического сечения, показывающую степень его отклонения от окружности. Выбор эксцентриситета для данной задачи объясняется тем, что форму клеток удобно описывать с помощью аппроксимации эллипсом (или окружностью), который является частным случаем конического сечения. Также, эксцентриситет является удобной оценкой формы клеток, так как отражает изменение соотношения длины большой и малой осей клетки. Эксцентриситет рассчитывали как $E =$

$$\sqrt{1 - \frac{b^2}{a^2}},$$

где a — длина большой оси, b — длина малой оси. Эксцентриситет

изменяется от 0 до 1, где значения, близкие к 0 соответствует круглым клеткам, а близкие к 1 — сильно вытянутым (Рис. 9). Длину большой и малой осей для каждой клетки на кадре вычисляли с помощью модуля ELLIPSE_FIT.

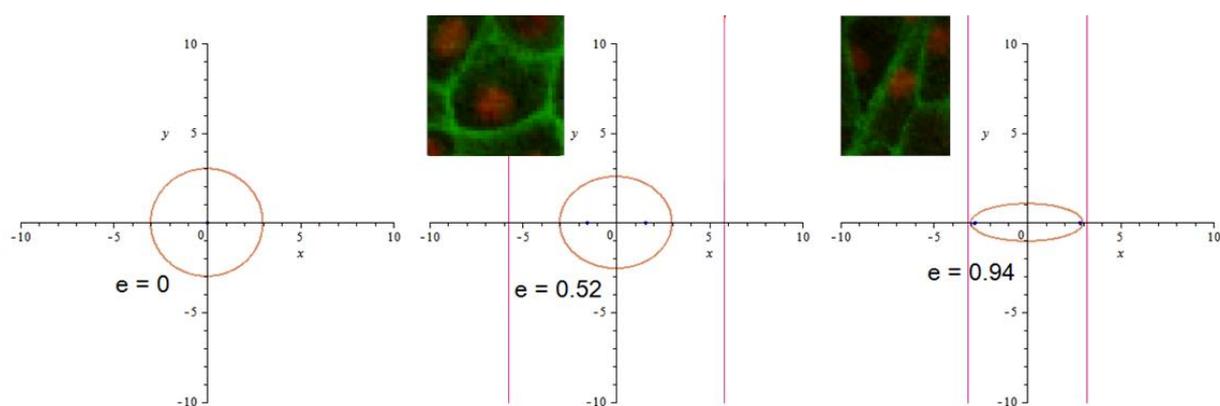


Рис. 9 Визуальная характеристика отдельных значений эксцентриситета. Сверху слева над визуализацией представлена фотография клетки с данным значением эксцентриситета.

5) Для расчёта микродеформаций т. е. изменения расстояния между двумя контактирующими клетками, применяли плагин GRAPH_VIEW в составе EpiTools 2.1.6.с помощью которого получали список контактирующих клеток. Используя это список и полученные с помощью модуля CELL_OUTLINE (ПО EpiTools 2.1.6.) координаты геометрических центров клеток, рассчитывали расстояние между клетками с помощью библиотеки Pandas для языка программирования Python.

Статистический анализ.

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

Сначала исследуемую выборку проверяли на соответствие нормальному распределению с помощью критерия Шапиро-Уилка (STATISTICA 10.0.). Если распределение значений выборки не отличалось от нормального, к ней применяли, в зависимости от задач, U-критерий Манна-Уитни для оценки разницы средних, F-тест на различие выборочных дисперсий (Python 3.10.2) и (или) дисперсионный анализ с повторяющимися измерениями (STATISTICA 10.0.).

Для использования U-критерия Манна-Уитни использовали функцию 'mannwhitneyu' из модуля 'scipy.stats' (Python 3.10.2) .

Для проведения F-теста на различие дисперсий в Python 3.10.2 рассчитывали F- статистику – вычисляли дисперсию для каждой из сравниваемых выборок с помощью библиотеки NumPy (Python 3.10.2), и делили наибольшее значение дисперсии на наименьшее. Затем, с помощью модуля 'scipy.stats' из библиотеки SciPy (Python 3.10.2) вычисляли р-значения для F-статистики. Если р-значение превышало 0,05, а значение F-статистики было больше критического, дисперсии выборок считали статистически различающимися.

Если распределение значений в выборке отличалось от нормального, использовали только U критерий Манна-Уитни для оценки разницы средних.

Результаты

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

Один из способов перегруппировок клеток в ходе гаструляции – образование т.н. клеточных розеток. Клеточные розетки являются промежуточным этапом специфических, пространственно ориентированных перегруппировок клеток. Такие перегруппировки могут иметь морфогенетическое значение: в гаструляции *D. melanogaster* через формирование и "распад" клеточных розеток происходит реориентация тяжей клеток вдоль передне-задней оси эмбриона, что приводит к её удлинению [9]. Чтобы оценить, как перегруппировки клеток через розетки соотносятся с картой механических напряжений в гаструляции *X. laevis*, мы подсчитали плотность клеточных розеток в регионах, качественно различающихся по величине механических напряжений. Согласно картам механических напряжений, составленным Белоусовым [2, 5], наиболее механически напряжённым регионом зародыша является супрабластопоральная область (Рис. 10А). В анимальном направлении напряжение в ткани постепенно падает, и значительно снижается в области крыши бластоцеля. В связи с этим, мы выбрали супрабластопоральную область как регион гаструлы, который в нормальном развитии находится под действием выраженных механических напряжений, а крышу бластоцеля – как регион с низкими значениями напряжений в ткани.

За клеточную розетку принимали группу апексов 5 и более схожих по размеру клеток, границы которых сходятся в точку контакта (Рис. 10Б-Б’'). В анализе не учитывали розетки, центральная точка которых является апикально сокращенной клеткой. Показано, что такой тип розеток быстро распадается и не сопряжен с процессами вытяжения ткани [29].

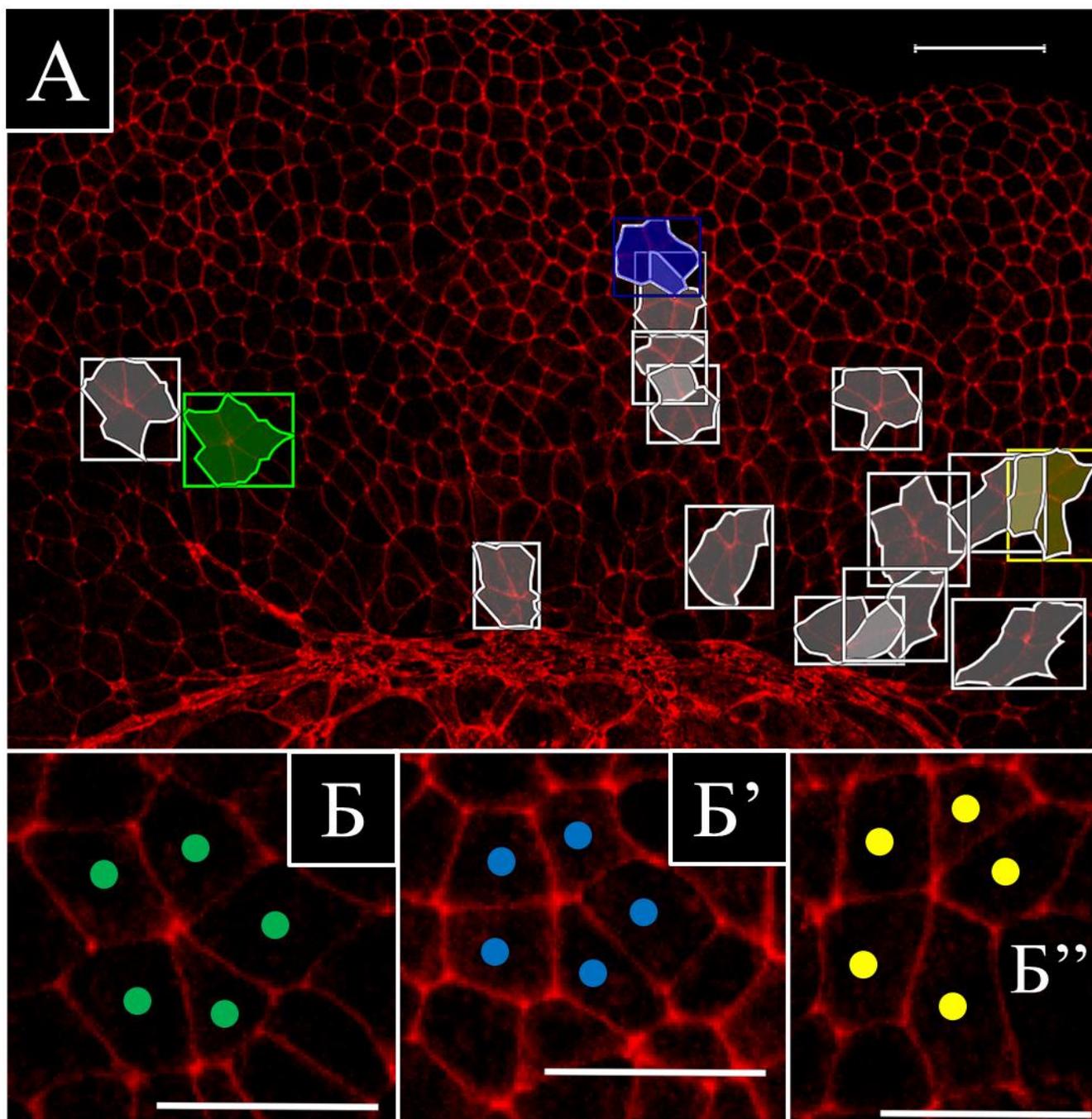


Рис. 10 Исследование частоты перегруппировок клеток в супрабластопоральной области интактной гастрюлы *X. laevis* (окрашивание границ клеток (F-актина) Rhodamine-phalloidin, красный). (А) Пространственная локализация розеток. Масштабный 100 мкм (Б) Пример клеточных розеток. Точки – отдельные клетки в составе розетки, цвет точек соответствует цвету розетки на (А). Масштабный отрезок 50 мкм.

Также, мы исключали розетки из анализа, если:

- образующие их клетки имели неодинаковую протяжённость границ;
- две и более клетки имели округлую форму.

Эти два фактора позволяли нам отличать розетки от точек контакта, возникающих в результате митоза (Рис. 11, А-В). Такие «ложные» розетки имеют характерный рисунок – в них присутствует одна крупная вытянутая клетка (Рис. 11, клетка №91), вырост которой проходит между двух округлых клеток, возникших в результате митоза (Рис. 11, клетки №№187 и 188).

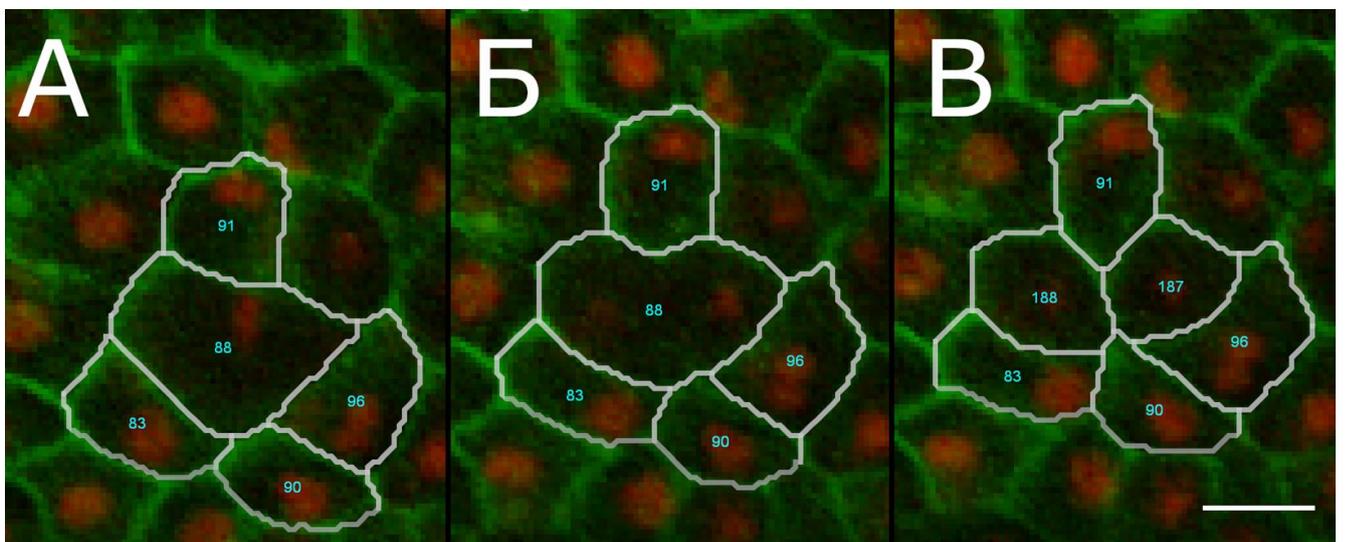


Рис. 11 Возникновение точки контакта 5 клеток в результате митотического деления. (цифры соответствуют индивидуальной клетке). Подобные «ложные» розетки не учитывались, так как они возникли не в результате перегруппировки клеток. Прижизненное маркирование мембран и ядер с помощью GAP43-GFP (зелёный) и H2B-RFP (красный) соответственно, масштабный отрезок 20 мкм.

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, филаментарный актин которых был окрашен Rhodamine-phalloidin. Плотность розеток вычисляли как отношение числа розеток к площади исследуемой области в мм². Ключевые статистические показатели приведены в Таблице 1.

Минимальная и максимальная плотность розеток в супрабластопоральной области составила 23 и 51 шт/мм² соответственно, для крыши бластоцеля – 8 и 25

шт/мм². Средние значения плотности розеток различались в обоих регионах и составили 37 шт/мм² для супрабластопоральной области и 16 шт/мм² для крыши бластоцеля. Дисперсии также различались в исследуемых регионах и составили 68 для супрабластопоральной области и 15 для крыши бластоцеля (Таблица 1). Распределение обеих выборок достоверно не отличается от нормального согласно критерию Шапиро-Уилка (Рис. 12), поэтому для оценки статистической значимости различий средних применили U-критерий Манна-Уитни, а для оценки различий уровня изменчивости – F-тест для сравнения выборочных дисперсий.

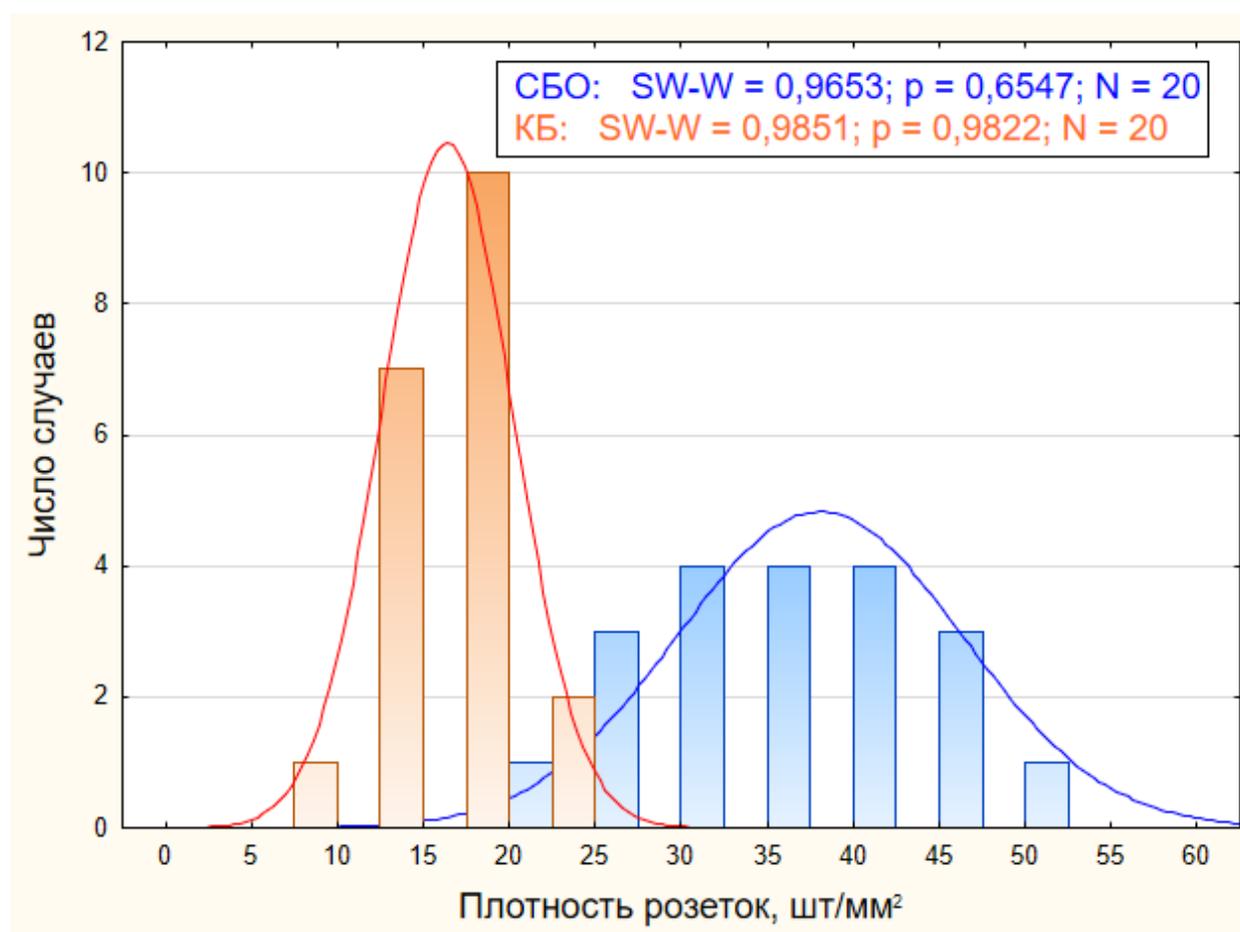


Рис. 12 Распределение плотности розеток для исследованных эмбрионов. СБО - супрабластопоральная область (синяя гистограмма), КБ - крыша бластоцеля (оранжевая гистограмма), в рамке: SW-W – статистика Шапиро-Уилка, p – p-значение, n – число эмбрионов.

Средние в обеих группах статистически достоверно отличались: значение U-статистики 1.0 меньше критического, равного 53 (p-значение << 0.05) (Таблица 2). Для того, чтобы установить, определяются ли обнаруженные различия средних именно регионом, мы применили дисперсионный анализ с повторными

измерениями. Значение F-статистики составило 202 при p-значении много меньшем 0.05 (Таблица 2). Таким образом, для каждого из эмбрионов средние значения плотности розеток в супрабластопоральной области и крыше бластоцеля статистически значимо различаются.

Дисперсии также достоверно отличались: значение F-статистики составило 4.7 при критическом значении 2.38 (p-значении = 0.0007) (Табл. 2).

Таким образом, среднее значение плотности клеточных розеток выше в супрабластопоральной области и обладает большим разбросом значений значений, т.е. частота встречаемости перегруппировок клеток в этом регионе больше, чем в крыше бластоцеля. Это, в свою очередь, означает, что частота встречаемости розеток выше в регионе с большими значениями механических напряжений.

Таблица 1 Ключевые статистические показатели для плотности розеток в супрабластопоральной области (СБО) и крыше бластоцеля (КБ).

	СБО	КБ
Число эмбрионов	20	
Среднее	37,86	16,30
Медиана	38,28	16,00
Дисперсия	68,32	14,53
Минимум	22,88	8,70
Максимум	51,20	24,79
Стандартное отклонение	8,27	3,81
Коэффициент асимметрии	-0,06	0,17
Коэффициент эксцесса	-0,79	0,15

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, осуществили количественное описание движений клеток эпизктодермы супрабластопоральной области в ходе гастрюляции *X. laevis* [78]. Для этого провели анализ пространственного распределения скоростей смещений клеток в исследуемой области эмбриона ($n = 1$), включающей 88 клеток (Рис. 13А). На момент начала съёмки эмбрион достиг стадии 10,5. На данной стадии начинается интернализация колбовидных клеток на дорсальной стороне эмбриона (Рис. 13А' и А'', пунктирная стрелка), а бластопор начинает распространяться в латеральных направлениях, формируя латеральные губы (Рис. 13А' и А'', сплошные стрелки).

Таблица 2 Результаты статистических тестов для значений плотности розеток в супрабластопоральной области и крыше бластоцеля.

	U-критерий Манна-Уитни		F-тест для сравнения выборочных дисперсий		Дисперсионный анализ с повторными измерениями		
	<i>U</i> вычисленная	<i>U</i> критическая	<i>F</i> вычисленная	<i>F</i> критическая	Пересечение (ошибка)	Регион (ошибка)	
Значение статистики	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
р-значение (*уровень значимости)	<<0.005	*0.05	0.0007	*0.05	<<0.005 (*0.05)	<<0.005 (*0.05)	

Пространственное распределение морфогенетических движений клеток также позволит оценить, какие регионы внутри исследуемой области зародыша могут потенциально характеризоваться наибольшими механическими напряжениями. Выявив такие регионы, можно провести более детальный, сравнительный анализ характерной для каждого из них пространственно-

временной динамики механических напряжений. Наиболее удобной функцией для этой задачи является параметр порядка S , так как он позволяет выявить регионы и временные интервалы с наименее сонаправленными смещениями клеток, и потому потенциально наиболее выраженными механическими напряжениями. Параметр порядка рассчитывали как косинус угла между вектором смещения отдельной клетки и антеропостериорной осью эмбриона (которая совпадала с осью 0° - 180° , где 0° соответствует вегетативному полюсу, а 180° – анимальному).

Однако выраженность механических напряжений зависит не только от направления движения клеток, но и от того, на какое расстояние они расходятся при смещении. Для этого необходимо соотнести значение скорости смещения клеток со значением параметра порядка. Скорость V рассчитывали как частное смещения отдельной клетки D за промежуток времени между двумя кадрами и продолжительности этого промежутка t ($V=D/t$). Так как интервал между кадрами цейтраферной съёмки составлял 1 мин, смещение клетки за промежуток времени между двумя кадрами представляет собой её среднюю скорость в мкм/мин.

Для каждого кадра цейтраферной съёмки мы упорядочили индивидуальные номера распознанных на нём клеток согласно их положению вдоль медиолатеральной оси эмбриона (т.е. согласно значению координаты соответствующей клетки по оси абсцисс). Затем построили график, на котором по оси абсцисс откладывали координаты геометрических центров клеток относительно медиолатеральной оси эмбриона, а по оси ординат – скорость смещения каждой клетки (Рис. 13Б). На полученном графике видно, что изначально скорости смещения клеток были равномерно распределены вдоль медиолатеральной оси (Рис. 13Б, серая линия). В течение наблюдения скорости смещений принимали наибольшие значения в медиальной (Рис. 13Б, оранжевая линия) или наиболее латеральных областях губы (Рис. 13Б, синяя линии), формируя градиент вдоль медиолатеральной оси. Чтобы статистически оценить пространственную неоднородность скоростей движения клеток, мы подразделили исследуемую область на отдельные регионы, так, чтобы каждый состоял из 29-30

клеток (Рис. 13В). В результате, исследуемая область оказалась подразделена на 3 региона.

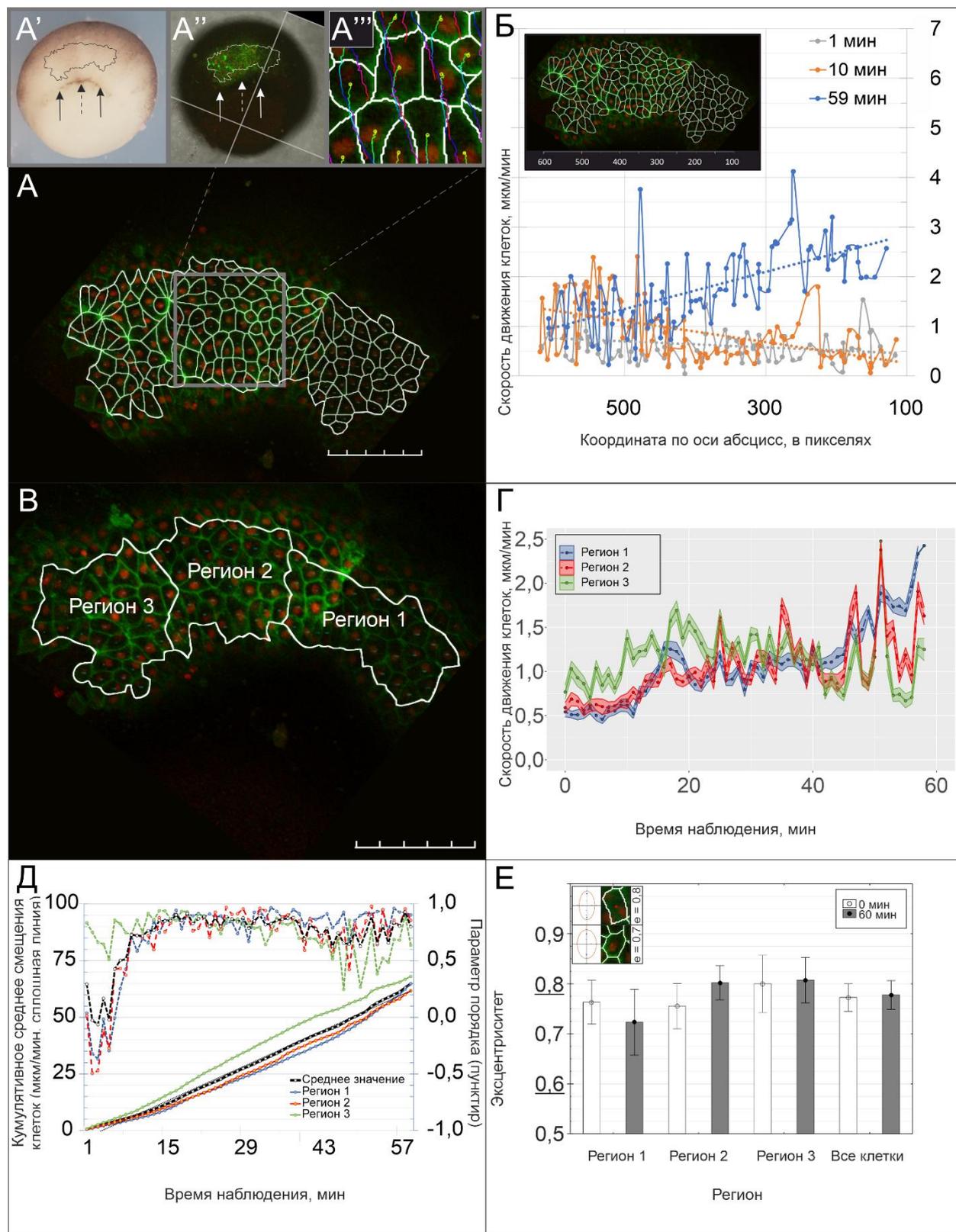


Рис. 13 Анализ пространственно-временной динамики смещений клеток (А) Общий вид дорсальной области эмбриона *X. laevis* на стадии 10-10,5 с

распознанными клеточными границами (А) и положение исследуемой области в эмбрионе (А', А''). Для каждой из распознанных клеток (А) была прослежена траектория её смещения в течение часа (А'''). Для каждой траектории цветом обозначены её начальный (желто-зелёный интервал), промежуточный (сине-фиолетовый интервал) и конечный (оранжево-красный интервал) участки. Прижизненное маркирование мембран и ядер с помощью GAP43-GFP (зелёный) и H2B-RFP (красный) соответственно. Масштабный отрезок 100 мкм, деление – 20 мкм. (Б) Оценка пространственной однородности смещения клеток вдоль медиолатеральной оси. В течение наблюдения распределение величины смещений отклоняется от равномерного (1 минута наблюдения, серая сплошная линия), и наибольшие значения смещений преобладают в медиальной (10 минут наблюдения, оранжевая сплошная линия) или латеральной (59 минут наблюдения синяя сплошная линия) областях губы бластопора. По оси абсцисс: координата геометрического центра клетки. По оси ординат: величина смещения за интервал между текущим и следующим кадрами. Пунктирная линия – линейный тренд. На графике приведены данные для начала (смещения за 1-ю и 10-ю минуту наблюдения) и конца (59-я минута наблюдения) съёмки. (В) Для оценки динамики пространственной однородности смещения клеток вдоль медиолатеральной оси вся исследуемая область была разбита на три региона по 29-30 клеток (линейка соответствует 100 мкм, деление – 20 мкм). (Г) Чтобы статистически оценить региональные различия скоростей смещения, для каждого из регионов была рассчитана средняя скорость смещения клеток. Центральная линия – средняя скорость смещения в регионе, заливка – стандартная ошибка среднего. (Д) Для более удобного анализа для каждого из регионов были рассчитаны кумулятивное среднее скоростей смещения клеток и среднее параметра порядка для каждого из кадров съёмки. Сплошные линии (ось ординат слева): кумулятивное среднее смещение клеток (средние скоростей смещения клеток были последовательно суммированы в течение всего времени наблюдения). Полученный график демонстрирует, что наибольшие значения смещений клеток в начале наблюдения обнаруживается в регионе 3. Затем динамика скоростей уравнивается во всех трёх регионах, но к концу наблюдения достигает наибольших значений в регионе 1. Пунктирные линии: среднее значение параметра порядка $S = \langle \cos(\alpha) \rangle$ для каждого из регионов. (Е) Для выявления локальных деформаций внутри регионов оценили динамику эксцентриситета клеток. Нам не удалось выявить статистически достоверных различий между эксцентриситетом клеток в начале и в конце наблюдения во всех трёх регионах, ровно, как и в среднем по всем клеткам исследуемой области.

Для каждого из трех получившихся регионов проследили динамику средней скорости смещений клеток и среднего параметра порядка (S). Абсолютные значения средней скорости движения клеток в регионе 3 превышают таковые в регионах 1 и 2, и в течение первых 15-18 минут съёмки демонстрируют тенденцию к возрастанию (Рис. 13Г). Однако, в силу выраженных колебаний

средней скорости смещений отдельных клеток достоверно выявить тренд при подобном представлении данных затруднительно. Для этого удобнее выводить на график кумулятивное среднее скоростей смещения клеток, т.е. не абсолютные значения средней скорости, а последовательность сумм средних скоростей за все предшествующие данному интервалы наблюдения (Рис. 13Д, сплошные линии, ось ординат слева). Тогда график будет иметь более линейную форму, что упростит сравнение регионов между собой. Такой график более отчётливо демонстрирует, что, хотя изначально средние скорости клеток практически идентичны для всех регионов, в первые 15-18 минут наблюдения средняя скорость клеток в регионе 3 (Рис. 13Д, сплошная зелёная линия) растёт быстрее таковых в регионах 1 и 2, и в среднем по всем клеткам исследуемой области зародыша.

Это можно определить по более пологой форме графика на этом интервале. Одновременно с этим, мы сравнили среднее значение параметра порядка (S) для каждого региона со средним для всех 88 клеток образца, что позволило выявить региональные различия в сонаправленности клеточных движений (Рис. 13Д, пунктирные линии, ось ординат справа). Так, значение параметра порядка в регионе 3 систематически превышает среднее по всем клеткам образца в течение первых 6 минут наблюдения (Рис. 13Д, зелёная пунктирная линия). Этот вывод подтверждается статистически с помощью критерия Манна-Уитни: для первых 6 кадров съёмки значение параметра порядка в регионе 3 (значение p -value меньше 0,01) статистически достоверно отличается от среднего для всех клеток эмбриона, в отличие от регионов 1 и 2.

На интервале 6-24 мин наблюдения параметр порядка (S) возрастает во всех регионах, а его колебания уменьшаются. Одновременно с этим возрастают и скорости движения клеток: в области 19 минут для регионов 1 и 2 и в области 17 минут для региона 3 на графиках средней скорости явно присутствуют точки перегиба. В области 31й минуты наблюдения значения параметра порядка в регионах 1 и 2 начинают превышать таковые в регионе 3. С 47й минуты

наблюдения среднее значения параметра порядка в регионе 3 начинает статистически достоверно отличаться от среднего по зародышу в меньшую сторону. Одновременно с этим в регионе 3 замедляется рост средней скорости смещения клеток, что можно определить по возникновению второго перегиба на соответствующем графике (Рис. 13Д, сплошная зелёная линия, в области с 27й минуты.). Одновременно, в регионах 1 и 2 рост средней скорости продолжается. Это приводит к тому, что к концу наблюдения отличия в значениях средних скоростей значительно уменьшаются для всех трёх зон, а графики кумулятивных средних смещения клеток во всех трёх регионах отклоняются от линейной зависимости. Наиболее наглядно это отклонение визуализируется при сравнении графиков кумулятивного среднего смещения клеток для регионов с графиком для всех 88 клеток, который с высокой степенью достоверности аппроксимируется линейной зависимостью ($R^2=0,9953$).

Таким образом, скорость и сонаправленность смещений клеток выше в регионе 3 по сравнению с регионами 1 и 2.

Анализ пространственно-временной динамики микродеформаций

Охарактеризовав пространственное распределение активности морфогенетических движений, мы провели анализ микродеформаций, чтобы описать распределение механических напряжений в супрабластопоральной области. Ранее было показано, что в эпиэктодерме *X. laevis* в течение длительного времени действующие силы пропорциональны возникающим в ткани деформациям [41], поэтому микродеформации являются адекватной оценкой механических напряжений в ткани. Под микродеформациями понимали относительное изменение расстояния между геометрическим центрами контактирующих клеток на последовательных кадрах центрифальной съёмки, т.е. разность расстояния между выбранной парой клеток на текущем и предыдущем кадрах, делёную на расстояние между этой парой клеток на предыдущем кадре. Так как временной интервал между кадрами съёмки (1 минута) был много меньше продолжительности перегруппировок клеток в эпиэктодерме *X. laevis* [11],

микродеформации не учитывали изменение расстояние между клетками вследствие перегруппировок. Анализ выполнили внутри тех же трёх регионов супрабластопоральной области для того же эмбриона, который был описан в предыдущем разделе (Рис. 13А). Список контактирующих клеток создавали с помощью советующего модуля программы распознавания для границ, расстояние между клетками рассчитывали на основании этого списка по координатам их геометрических центров клеток.

Для каждого кадра из 60ти считали среднее, медиану, дисперсию и коэффициент вариации абсолютных значений микродеформаций внутри регионов и для всех клеток в кадре. Таким образом, для каждого из регионов (и всего эмбриона) получили 4 массива по 59 значений. Так как статические показатели рассчитывали для последовательных кадров цейтраферной съёмки, то исследовалась динамика статистических показателей во времени. Среднее и медиану выбрали как характеристики положения среднего в выборке, а дисперсию и коэффициент вариации - как характеристики разброса значений внутри выборки.

Таблица 3 Значение критерия Шапиро-Уилка для средних величин статистических показателей микродеформаций по регионам супрабластопоральной области. Красным выделены распределения достоверно отклоняющиеся от нормального.

	Среднее	Дисперсия	Медиана	КВ
Регион 1	0,96 p = 0.05	0.88 p << 0.05	0.96 p = 0.03	0.96 p = 0.04
Регион 2	0.97 p = 0.18	0.96 p = 0.04041	0.96 p = 0.07714	0.94 p = 0.003
Регион 3	0.91 p << 0.05	0.84 p << 0.05	0.86 p << 0.05	0.92177 p = 0.001
Весь эмбрион	0.95 p = 0.02	0.86 p << 0.05	0.96 p = 0.06	0.97 p = 0.13

Полученные ряды статистических показателей проверили на отличие от нормального распределения (Таблица 3). Так как распределение значений для большей части статистических показателей отклоняется от нормального, для проверки гипотезы о равенстве средних для абсолютных значений микродеформаций воспользовались U-критерием Манна-Уитни (Таблица 4).

Таблица 4 Значение U-Критерия Манна-Уитни для попарного сравнения средних абсолютных значений микродеформаций внутри регионов супрабластопоральной области. Красный цвет - отсутствие статистически значимого отличия средних.

	Регион 1	Регион 2	Регион 3
Регион 1	-	U = 2015.0 p = 0.14	U = 1232.0 p = 0.006
Регион 2	U = 2015.0 p = 0.14	-	U = 1005.0 p << 0.05
Регион 3	U = 1232.0 p = 0.006	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). 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. На кадрах съёмки удалось идентифицировать 12 розеток, из них 8 были локализованы в регионе 3, 3 – в регионе 2, и 1 – в регионе 1. Распознать все составляющие их клетки удалось только для 7 из 13 идентифицированных розеток. Из этих 8 розеток 3 были локализованы в регионе 3, 3 – в регионе 2, и 1 – в регионе 1. Интересно, что формирование одной из розеток в регионе 2 последовало за делением одной из клеток.

Ранее, с помощью анализа клеточной морфологии на фиксированных эмбрионах, было продемонстрировано, что розетки преимущественно локализируются в медиальной области супрабластопоральной области [20]. Эти данные позволяют нам более точно идентифицировать положение медиальной линии эмбриона. Оказалось, что она локализована в регионе 3, который, таким образом, соответствует медиальной зоне супрабластопоральной области. Таким образом, медиальная линия супрабластопоральной области не соответствует срединной линии исследуемой области и смещена влево относительно неё. Тогда регионы 1 и 2 являются участками одной из латеральных зон супрабластопоральной области. Исходя из этого, можно предположить, что регион 3 соответствует области зародыша, где наиболее активно протекает процесс инволюции.

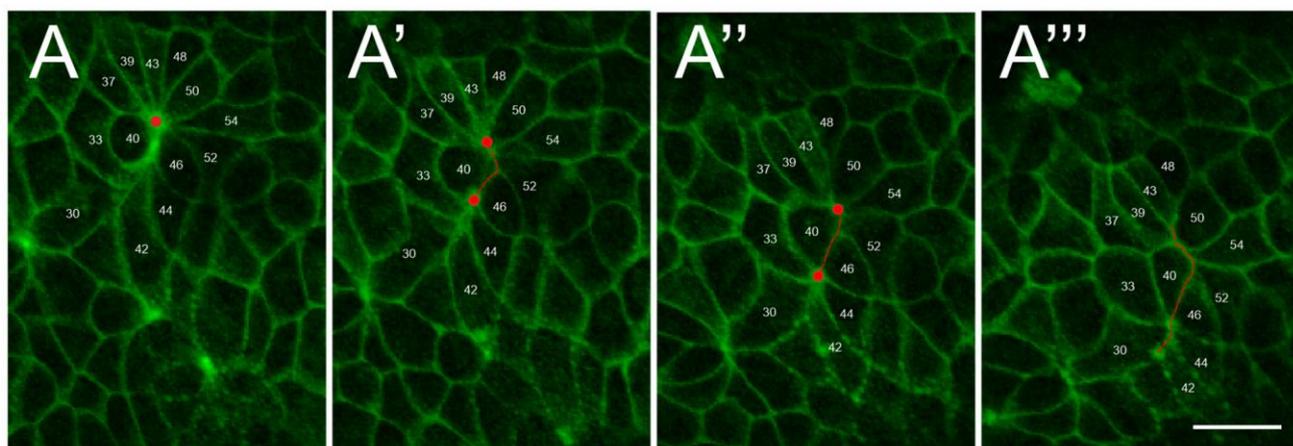


Рис. 14 Последовательные этапы распада клеточной розетки у *X. laevis*. (A) конфигурация розетки в момент начала съемки. (A'–A''') конфигурация розетки на 20-й, 40-й и 60-й минуте съемки (A', A'', и A''' соответственно). На (A', A'') можно наблюдать распад изначальной розетки на две новых, после чего на A''' центры розеток исчезают. Прижизненное маркирование мембран и ядер с помощью GAP43-GFP (зелёный) и H2B-RFP (красный) соответственно. Числа в клетках (белый шрифт) обозначают порядковый номер клетки, красная точка – центр розетки, красная пунктирная линия – формирующаяся новая граница контакта между клетками розетки. Масштабный отрезок 20 мкм.

Выбранное время наблюдения не позволило зарегистрировать процесс возникновения и распада розетки полностью, однако инициацию распада трех розеток удалось зафиксировать (рис. 14 A–A'''). В ходе распада розетки

изменяется направление наибольшей протяженности образующего её домена клеток [9]. Поэтому ориентация клеточных границ между формирующихся при распаде розетки тяжами, может служить оценкой внутритканевой деформации. В связи с этим, мы проанализировали протяженность и ориентацию границ клеток при распаде розеток. За протяженность границ принимали длину границы между формирующимися тяжами на момент окончания съёмки. 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 практически параллельно антерипостериорной оси. Согласно реконструкции карт механических напряжений, изложенной в [3], формирующиеся границы также оказываются параллельны линиям наибольшего напряжения внутри супрабластопоральной области. Это позволяет нам предположить, что наблюдаемые перестройки компенсируют усиленное растяжение поверхностного слоя клеток в ходе инволюции.

Клетки, вовлекающиеся в перегруппировки в составе розеток, имеют более вытянутую форму, чем остальные клетки супрабластопоральной области. Поэтому, чтобы установить зависимость перегруппировок клеток от микродеформаций в регионах, мы проанализировали форму границ клеток на полученной серии изображений в каждом из трёх регионов, чтобы затем численно охарактеризовать количество клеток, входящих в состав розеток. Важно уточнить, что в ходе съёмки регистрировали единичный оптический срез вблизи апикальной поверхности клеток эпизкодермы. В связи с этим, общей границей для пары соседних клеток мы будем называть зону контакта мембран этих клеток, попавшую на оптический срез, а формой клетки – форму сечения клетки, зарегистрированного на оптическом срезе.

Чтобы оценить форму клеток отдельных регионов, мы проанализировали динамику эксцентриситета (меры отклонения формы клетки от окружности) отдельных клеток в исследуемых регионах. Эксцентриситет изменяется от 0 до 1, где значения, близкие к 0 соответствует круглым клеткам, а близкие к 1 – сильно

вытянутым. Клетки в составе розеток характеризовались большим средним значением эксцентриситета (среднее значение по всем кадрам составило 0,83), по сравнению со средним значением по регионам (0,75, 0,76 и 0,8 для региона 1, региона 2 и региона 3 соответственно) и достоверно от них отличались ($U=0$, $p \ll 0,05$ для каждого из попарных сравнений среднего по регионам со средним по розеткам). Таким образом, эксцентриситет является удачной характеристикой числа клеток, вовлечённых в перегруппировки.

Таблица 5 Значение критерия Шапиро-Уилка для средних величин статистических показателей эксцентриситета по регионам супрабластопоральной области. КВ – коэффициент вариации. Красным выделены распределения достоверное, отклоняющиеся от нормального.

	Среднее	Дисперсия	Медиана	КВ
Регион 1	0.91 $p \ll 0.05$	0.81 $p \ll 0.05$	0.96 $p = 0.06$	0.81 $p \ll 0.05$
Регион 2	0.89 $p \ll 0.05$	0.96 $p = 0.03$	0.99 $p = 0.98$	0.95 $p = 0.01$
Регион 3	0.98 $p = 0.58$	0.97 $p = 0.09$	0.98 $p = 0.46$	0.97 $p = 0.23$
Весь эмбрион	0.96 $p = 0.05$	0.99 $p = 0.98$	0.99 $p = 0.72$	0.99 $p = 0.97$

Внутри отдельных регионов (ровно, как и по эмбриону в целом) не удалось выявить статистически значимых различий между средним значением эксцентриситета клеток в начале и в конце наблюдения (Рис. 13Е). Однако удалось выявить различия средних значений эксцентриситета между регионами. Для каждого кадра из 60ти считали среднее, медиану, дисперсию и коэффициент вариации для значений эксцентриситета внутри регионов и для всех клеток в кадре. Полученные последовательность статистических показателей проверили на отличие от нормального распределения (Таблица 5).

Так как распределение значений для большей части показателей отклоняется от нормального, для проверки гипотезы о равенстве средних эксцентриситета воспользовались U-критерием Манна-Уитни (Таблица 6).

Таким образом, среднее значение эксцентриситета в Регионе 3 (0,8) статистически достоверно отличается от значений в остальных регионах, в то время как между Регионами 1 и 2 такой разницы нет (0,75 и 0,76 соответственно). И так, в регионе 3 средние значения и микродеформаций, и эксцентриситета достоверно выше, чем в регионах 1 и 2.

Таблица 6 Значение U-Критерия Манна-Уитни для попарного сравнения средних значений эксцентриситета внутри регионов супрабластопоральной области.

	Регион 1	Регион 2	Регион 3
Регион 1	-	U = 1557.0 p = 0.2	U = 6.0 p << 0.05
Регион 2	U = 1557.0 p = 0.2	-	U = 188.0 p << 0.05
Регион 3	U = 6.0 p << 0.05	U = 188.0 p << 0.05	-

Чтобы связать динамику микродеформаций с динамикой эксцентриситета провели корреляционный анализ статистических показателей значений эксцентриситета клеток на кадре со средними статистических показателей микродеформаций в регионах. Так как значительная часть данных распределена ненормально, вычислили коэффициент ранговой корреляции Спирмена. Наиболее выраженные корреляционные связи были обнаружены в Регионе 2 (Таблица 7).

Таким образом, хотя средние значения микродеформаций и эксцентриситета клеток достоверно выше в регионе 3, значимой корреляции между микродеформациями и эксцентриситетом в этом регионе обнаружить не удалось. Однако, такую корреляцию наблюдали в регионе 2. Зависимость эксцентриситета клеток от микродеформаций в регионе 2 характеризуется отрицательной корреляцией средних значений микродеформаций и средних значений дисперсии и коэффициента вариации и положительной – для 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.

Таблица 7 Коэффициенты корреляции Спирмена для средних статистических показателей эксцентриситета клеток со статистическими показателями микродеформации для Региона 2. КВ – коэффициент вариации. Красным выделены достоверно вычисленные 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

Разработка установки для контролируемой одноосевой деформации эмбриональных тканей.

Для экспериментальной проверки предположения, что клеточные перестройки компенсируют усиленное растяжение ткани в ходе процесса гастрюляции, необходима методика контролируемого растяжения эксплантатов эмбриональной ткани. Для решения этой задачи мы провели работу по разработке установки для контролируемого автоматизированного растяжения эксплантатов эмбриональной ткани. При разработке установки необходимо одновременно учесть четыре основных требования:

1. Дискретность растяжения, т.е. минимальная величина, на которую деформируется субстрат, должна быть много меньше среднего диаметра клетки (для клеток супраблостопоральной области на стадии гастрюлы он составляет 20 мкм). Это, в свою очередь, налагает ограничения на используемые системы микропозиционирования.

2. Установка должна поддерживать возможность прижизненного наблюдения за объектом исследования чтобы, например, исследовать перегруппировки клеток *in vivo*. Это в свою очередь, создаёт предпосылки для следующего требования.
3. Необходимо обеспечить максимально возможную компактность установки. Компактность установки для растяжения может являться критическим параметром, т. к. конструкция микроскопа (расстояние от конденсора до поверхности предметного столика, диаметр конденсора, наличие бокса) может налагать пространственные ограничения на размеры установки и потому осложнять использование устройства для растяжения. При этом установка должна также обладать симметричным дизайном и распределением веса, чтобы обеспечить устойчивость установки при размещении на микроскопе.
4. Несмотря на компактный дизайн, установка должна обеспечить широкий диапазон амплитуды деформации субстрата, т. к. возникающие в ходе эмбрионального развития кумулятивные деформации могут достигать 200% [13, 21], в то время как большинство установок для растяжения (особенно коммерческих) ориентированы на деформации субстрата, не превышающие 20% (StrexCell, 2018; NanoSurface, 2018). Необходимо также учесть, что растяжение субстрата передаётся на культивируемые объекты не в полном объеме, с эффективностью от 56,2% до 77,2% [49, 72].

Для обеспечения высокой дискретности деформации, в качестве систем микропозиционирования для были выбраны гибридные шаговые актуаторы. Позиционирование подвижной части шагового актуатора – штока – осуществляется благодаря вращению ротора. За счёт резьбового соединения со штоком ротор преобразует собственное вращение в поступательное движение штока. Для минимизации дискретности растяжения такое устройство актуатора является преимуществом, т. к. с помощью специальной технологии можно уменьшать минимальный угол вращения ротора, и, соответственно, уменьшать минимальный сдвиг штока. Применённые в установке шаговые актуаторы, обладают дискретностью перемещения в 2 мкм. При использовании

восьмикратного дробления шага дискретность растяжения увеличивается с 2 мкм до 0,25 мкм, что в 80 раз ниже среднего диаметра клеток супрабластопоральной области *X. laevis*. Одновременно, использование шаговых актуаторов типоразмера 8 по стандарту NEMA ICS 16-2001 позволило добиться высокой степени компактности установки.

Для возможности прижизненного наблюдения установка позволяет использовать в качестве субстрата сверхтонкую эластичную плёнку. Одновременно, использование плёнки обеспечивает широкий диапазон амплитуды деформации субстрата. Максимально возможная амплитуда деформации субстрата при использовании этого варианта креплений достигает 150%: при использовании плёнки длиной 50 за счёт того, что максимальное расстояние между креплениями составляет 78 мм, максимально возможная деформация составляет 150%. Используя плёнку длиной 39 мм можно добиться 200% деформации субстрата. Главным преимуществом использования этого субстрата, помимо, высокой амплитуды максимальной деформации, является высокая равномерность деформации вследствие того, что края плёнки в подобных тисках фиксируются на протяжении всей своей длины. Ключевым недостатком этого субстрата является потенциальный риск разрыва плёнки. Для возможности разместить иные исполнения субстрата для культивирования, установка оборудована полностью сменными креплениями для субстрата. Второй тип крепления, реализованный в установке, позволяет использовать коммерчески доступные инкубационные камеры. Такие камеры имеют ограниченную амплитуду деформации (как правило, до 20%), но отличаются большей надёжностью (Рис. 15А).

Дополнительной целью данного изобретения было создание установки с конфигурируемыми узлами, которая бы поддерживала использование различных форм-факторов субстрата для культивации, а также возможность разместить на установке для растяжения дополнительные электронные устройства. Для этих целей установка снабжена печатной платой, которая. Помимо возможности

разместить на установке дополнительные устройства, печатная плата интегрирует выходы электронных компонентов (шаговых двигателей, датчиков конца хода) в единый кабель.

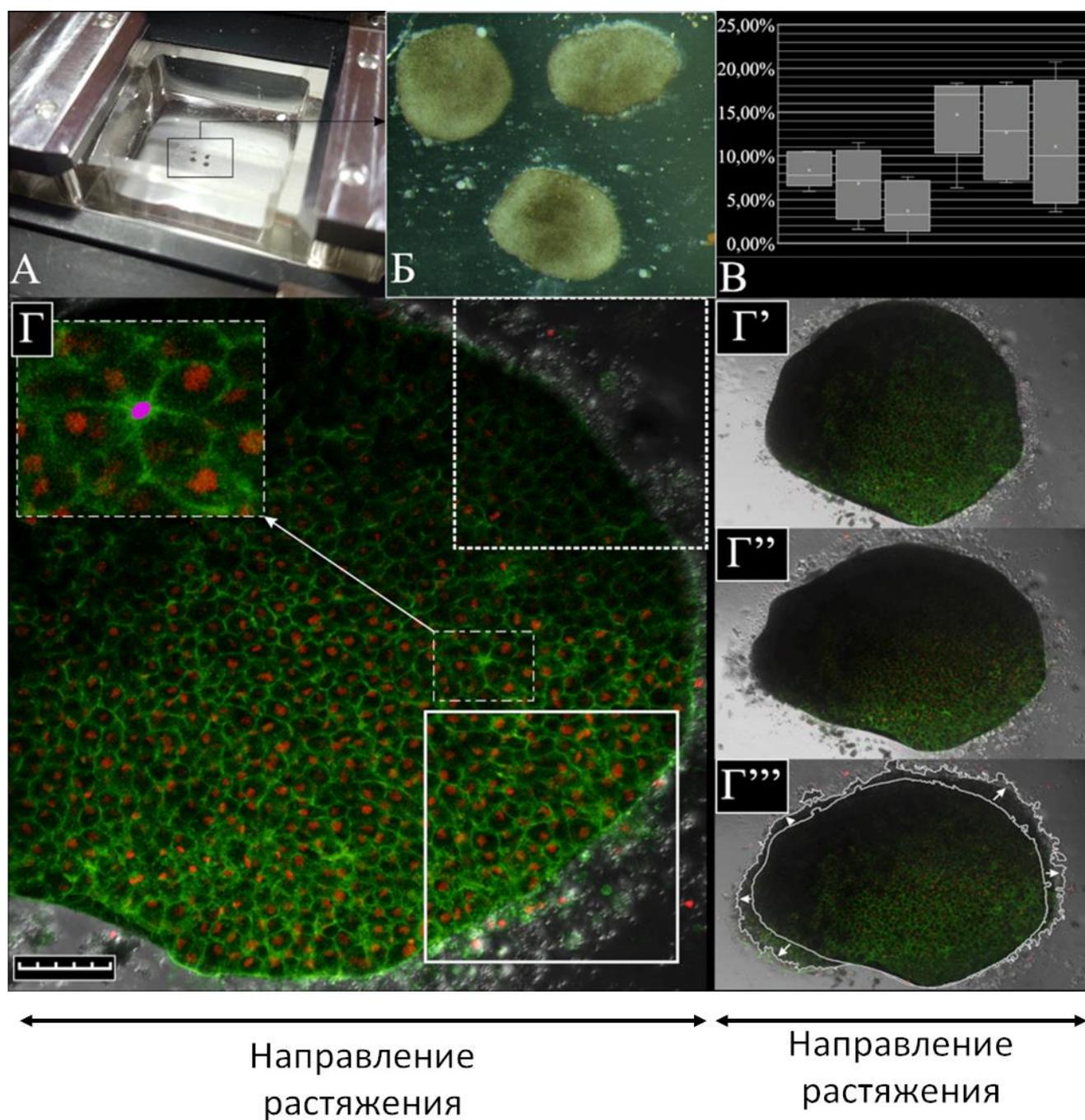


Рис. 15 Искусственная деформация эксплантатов крыши бластоцеля гастролы *X. laevis*. (A) Инкубационная камера с эксплантатами крыши бластоцеля во время двухчасовой инкубации. (Б) Общий вид эксплантатов крыши бластоцеля после двухчасовой инкубации на эластичном субстрате. (В) Определение эффективности искусственной деформации эксплантатов эмбриональной ткани. По оси ординат: удлинение эксплантата вдоль оси растяжения в %. Каждая

диаграмма соответствует группе из 4-6 эксплантатов, крестик – среднее удлинения в группе, линия – эксклюзивная медиана. Средняя эффективность удлинения составила $54,7\% \pm 26,5\%$. (Г) Кадр цейтраферной съёмки эксплантата крыши бластоцеля после растяжения, вид со стороны гипоектодермы. Прижизненное маркирование мембран и ядер с помощью GAP43-GFP (зелёный) и H2B-RFP (красный) соответственно. Масштабный отрезок 100 мкм. (Г'-Г''') – фотографии эксплантата крыши бластоцеля перед растяжением (Г'), после растяжения (Г'') и по окончании часовой цейтраферной съёмки (Г'''); белый контур: границы эксплантата в начале и в конце съёмки, стрелки – направление смещения границы).

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

Определение эффективности искусственной деформации эксплантатов эмбриональной ткани

Мы оценили эффективность разработанной методики растяжения на 6 группах эксплантатов [10]. Эффективность растяжения эксплантатов ткани рассчитывали как частное среднего удлинения в группе из 4-6 эксплантатов и удлинения самой инкубационной камеры (Рис. 15В). 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, таким образом, обеспечивает оптимальную проверку степени адгезии эксплантата ко дну камеры.

При выбранных концентрации фибронектина и протоколе его нанесения растяжение субстрата передаётся на эксплантаты с эффективностью $54,7\% \pm 26,5\%$ [10], что, в целом, согласуется с описанными в литературе данными (от 56% до $77,2 \pm 20,4\%$ [49, 72]).

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

Для исследования влияния искусственно приложенной механической силы на перегруппировку клеток вырезали фрагменты крыши бластоцеля гастролы *X. laevis* на стадии 10-10 ½. Эксплантаты крыши помещали в инкубационную камеру гипоектодермой на субстрат, аккуратно прижимали покровным стеклом на

силиконовых ножках (Рис. 15А), после чего инкубировали в течение двух часов для стимуляции адгезии эксплантатов к матриксу. После двух часов инкубации покровное стекло снимали (Рис. 15Б).

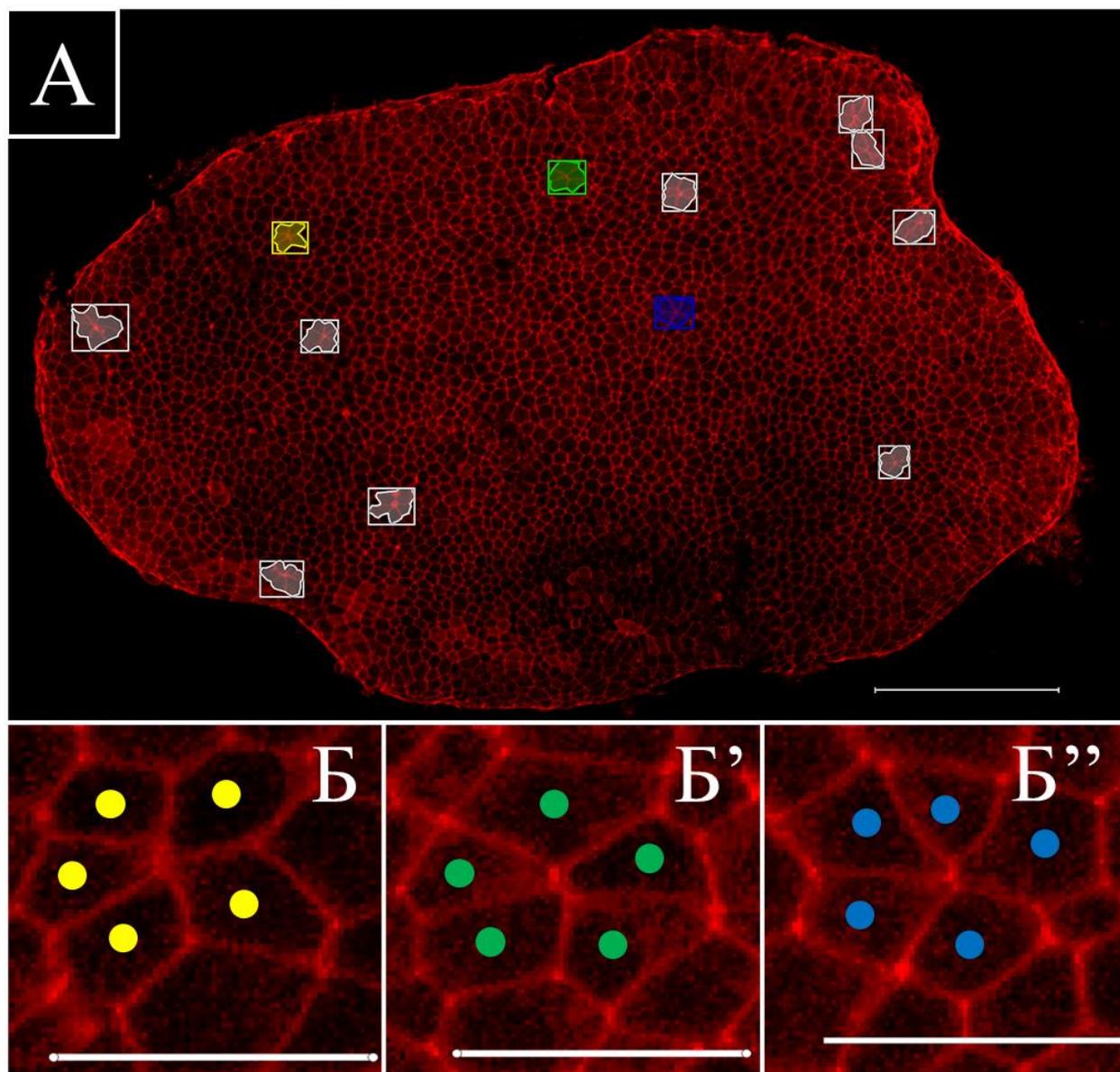


Рис. 16 Исследование частоты перегруппировок клеток в искусственно деформированных эксплантатах крыши бластоцеля *X. laevis* (окрашивание границ клеток (F-актина) Rhodamine-phalloidin, красный). (А) пространственная локализация розеток на примере тянутого эксплантата, зафиксированного через 40 минут после начала эксперимента. Масштабный отрезок 100 мкм. (Б) пример клеточных розеток. Точки – отдельные клетки в составе розетки, цвет точек соответствует цвету розетки на А. Направление растяжения совпадает с горизонтальной осью изображения. Масштабный отрезок 50 мкм.

Часть эксплантатов фиксировали уже на этом этапе, далее мы будем называть их "прикреплёнными". Чтобы установить влияние прикрепления к

субстрату на число розеток в ткани, *прикрепленные* эксплантаты фиксировали и визуализировали филаментарный актин с помощью Rhodamine Phalloidin. Оставшиеся эксплантаты включали в эксперимент делили на две группы.

Таблица 8 Ключевые статистические показатели для плотности розеток в эксплантатах крыши бластоцеля.

ЭКСПЛАНТАТЫ	Прикрепленные (N = 15)	40 минут		70 минут	
		Нетянутые (N = 15)	Тянутые (N = 16)	Нетянутые (N = 13)	Тянутые (N = 17)
Среднее	4,06	7,42	6,12	16,81	13,56
Медиана	3,34	6,97	5,82	17,59	12,99
Дисперсия	4,12	5,11	3,02	60,76	13,74
Минимум	2,24	4,33	3,06	4,37	7,96
Максимум	9,48	11,55	10,42	33,85	21,33
Стандартное отклонение	2,03	2,26	1,74	7,80	3,71
Коэффициент асимметрии	1,69	0,25	0,70	0,27	0,61
Коэффициент эксцесса	2,69	-1,00	1,45	1,04	-0,21

Эксплантаты первой экспериментальной группы в дальнейшем будем называть "*тянутыми*". Их подвергали растяжению на 15-17%. Учитывая, что растяжение субстрата передаётся на эксплантаты не в полной мере, саму инкубационную камеру растягивали на 20% от исходной длины в течение 10

минут. Такие параметры растяжения были выбраны для того, чтобы, с одной стороны время растяжение было меньше известного времени перегруппировки клеток [11], а с другой - чтобы скорость растяжения была близка к физиологической. Согласно данным, полученным в нашей лаборатории, деформация супрабластопоральной области интактной средней гастролы *X. laevis* достигает 72% от изначальной длины в час [22]. По окончании растяжения, эксплантаты оставляли в растянутом состоянии на необходимое время (30 или 60 мин), после чего фиксировали и визуализировали филаментарный актин с помощью Rhodamine Phalloidin (Рис. 16). Таким образом, с учетом времени растяжения, фиксацию осуществляли через 40 минут и через 70 минут после начала эксперимента.

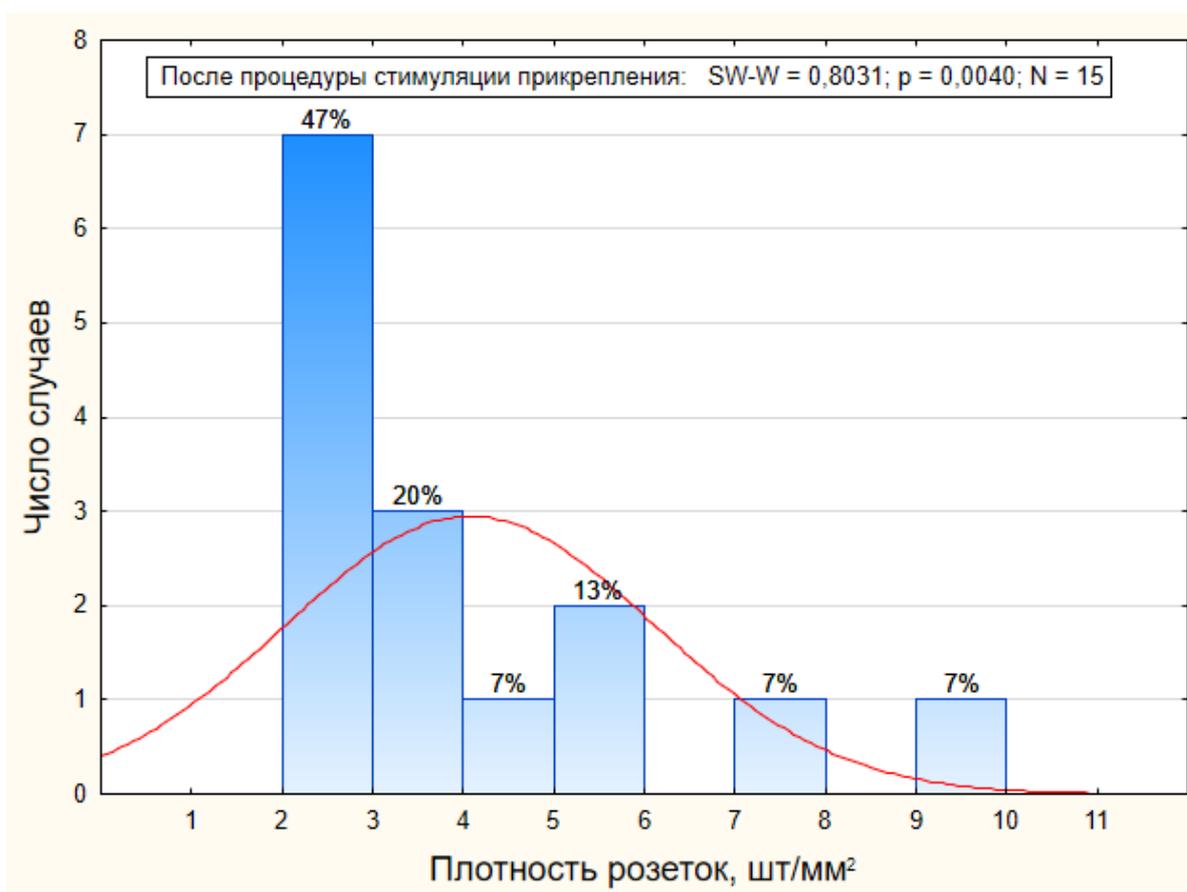


Рис. 17 Распределение плотности розеток для эксплантатов, зафиксированных сразу после прикрепления к субстрату. В рамке: SW-W – статистика Шапиро-Уилка, p – p-значение, n – число эксплантатов.

Эксплантаты второй экспериментальной группы будем называть "нетянутыми". Они не подвергались растяжению, но фиксировались через тот же временной промежуток, 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 и вычисляли плотность розеток как отношение числа розеток к площади исследуемой области в мм². Ключевые статистические показатели плотности розеток приведены в Таблице 8.

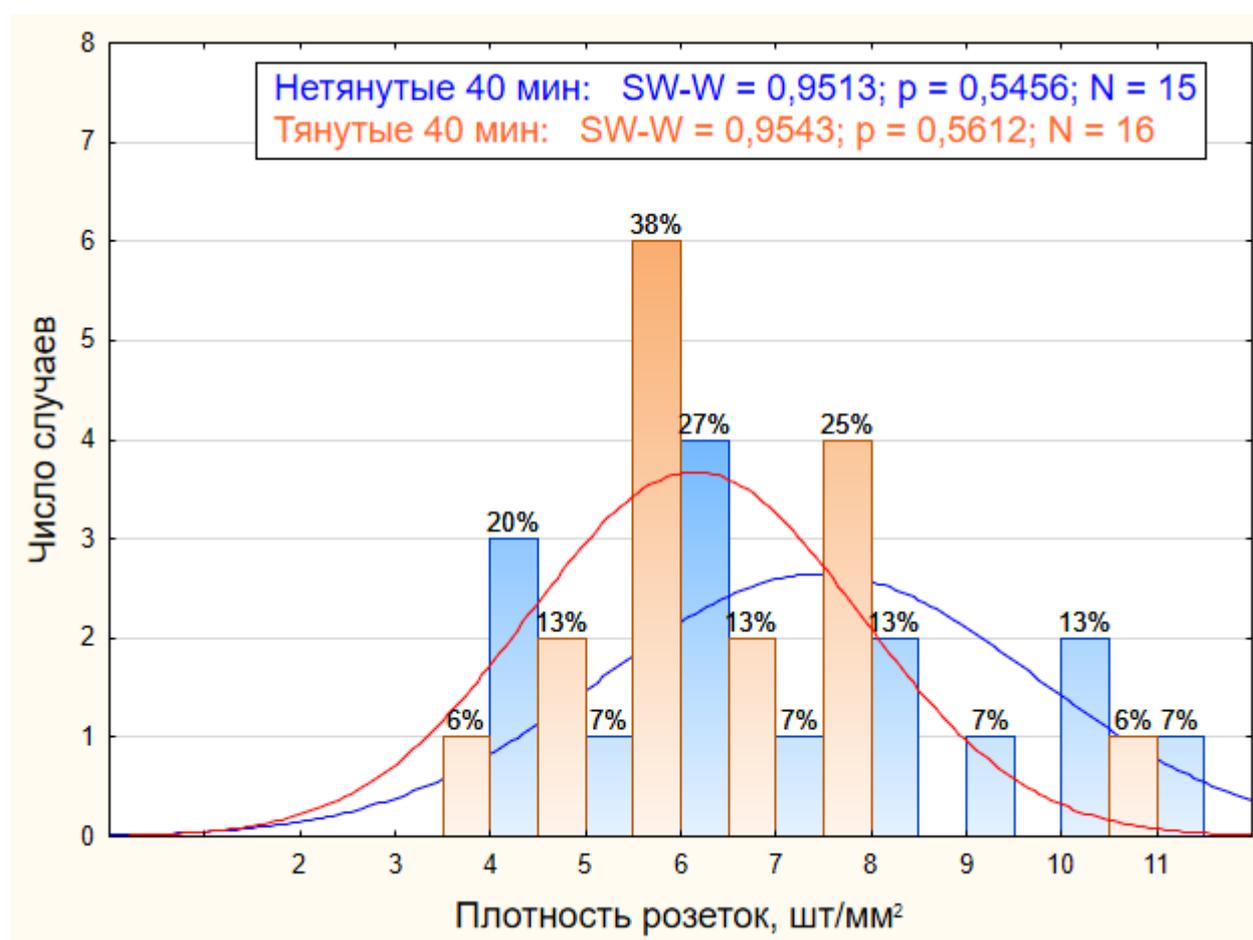


Рис. 18 Распределение плотности розеток для эксплантатов, зафиксированных через 40 минут после начала эксперимента. Синяя гистограмма – *нетянутые* эксплантаты, оранжевая гистограмма – *тянутые* эксплантаты, в рамке: SW-W – статистика Шапиро-Уилка, p – p-значение, n – число эксплантатов.

Для *прикрепленных* эксплантатов (зафиксированных сразу после прикрепления ко дну инкубационной камеры) (n=15), минимальная плотность

розеток составила 2 шт/мм², максимальная – 10 шт/мм². Среднее значение плотности розеток составило 4 шт/мм², значение дисперсия – 4,1. Согласно критерию Шапиро-Уилка (Рис. 17), распределение отличалось от нормального, поэтому для сравнения с экспериментальными группами применяли только U критерий Манна-Уитни для проверки различий средних.

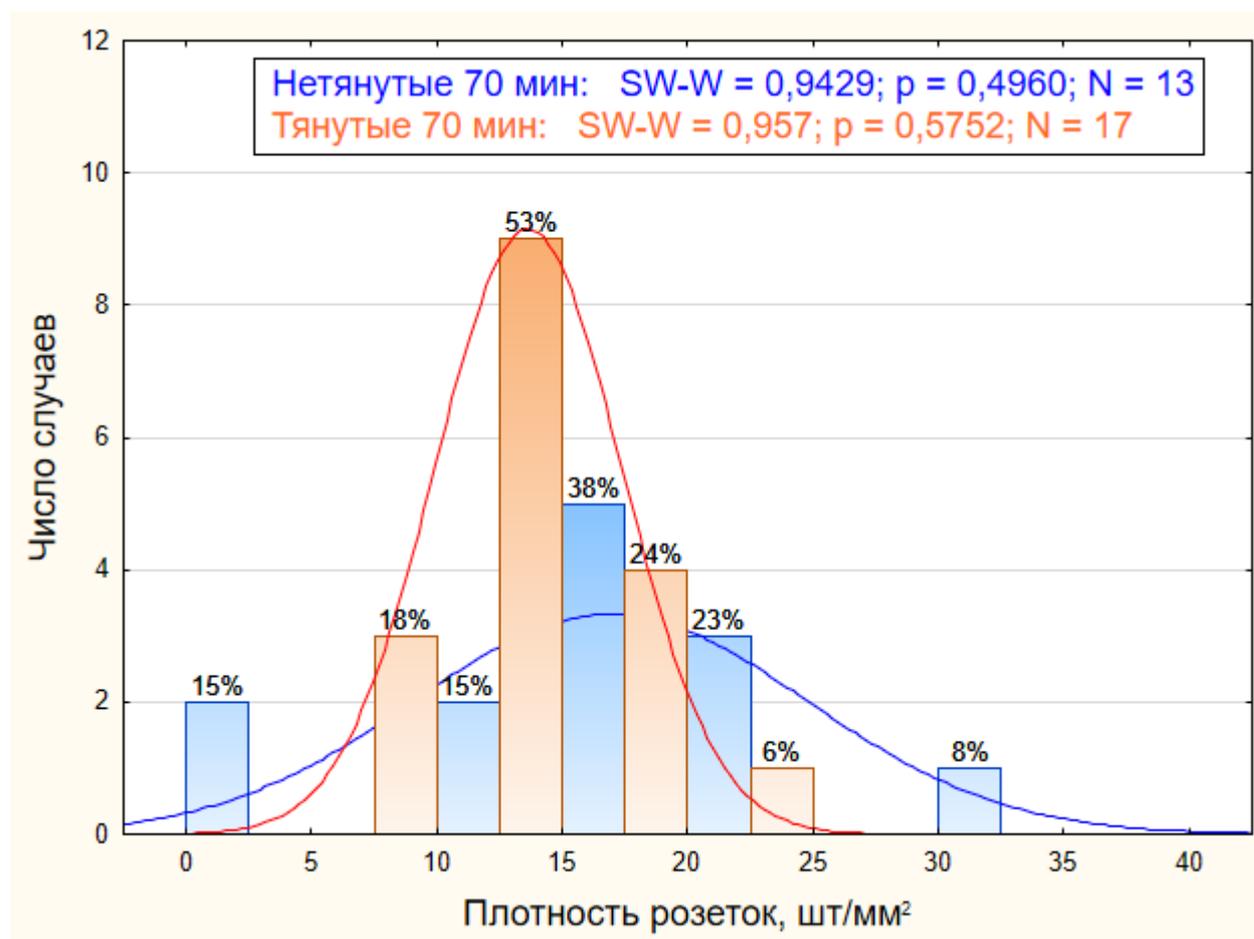


Рис. 19 Распределение плотности розеток для эксплантатов, зафиксированных через 70 минут после начала эксперимента. Синяя гистограмма – *нетянутые* эксплантаты, оранжевая гистограмма – *тянутые* эксплантаты, в рамке: SW-W – статистика Шапиро-Уилка, p – p-значение, n – число эксплантатов.

Для эксплантатов, зафиксированных через 40 минут после начала эксперимента, минимальная плотность розеток составила 4 шт/мм² в случае нетянутых (n = 15 шт), и 3 шт/мм² случае *тянутых* (n = 16 шт), а максимальная – 12 и 10 шт/мм² для *нетянутых* и *тянутых*, соответственно. Средние значения плотности клеточных розеток были примерно одинаковы для *нетянутых* и *тянутых* эксплантатов, и составили 7 и 6 шт/мм² соответственно. Значение

дисперсий также значимо не различалось внутри экспериментальной группы и составило 5 и 3 соответственно для *нетянутых* и *тянутых*. Согласно критерию Шапиро-Уилка, оба распределения не отличались от нормального (Рис. 18), поэтому при сравнении экспериментальных групп использовали как U критерий Манна-Уитни для проверки различий средних, так и F-тест для сравнения выборочных дисперсий. Как средние ($U = 156$, p -значение = 0,16), так и дисперсии ($F = 1.69$, p -значение = 0,16) статистически достоверно не отличались внутри экспериментальной группы, зафиксированной через 40 минут после начала эксперимента.

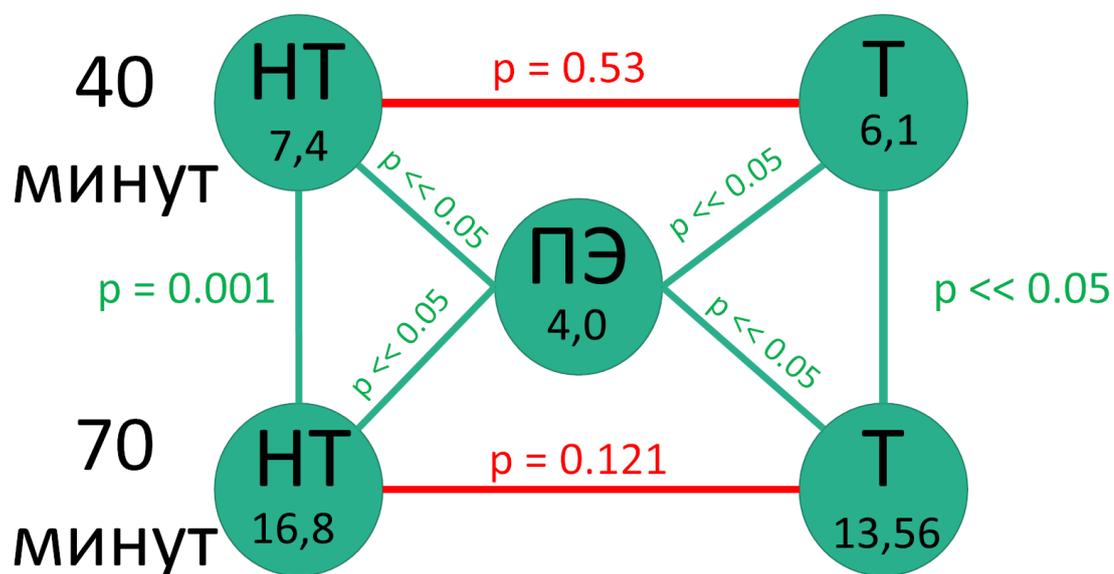


Рис. 20 Парное сравнение средних значений плотности клеточных розеток в эксплантатах крыши бластоцеля. Приведены средние значения плотности клеточных розеток и p -значения для U-Критерия Манна-Уитни. Красные линии означают отсутствие достоверного различия, зеленые – наличие достоверного различия значений средних. НТ - *нетянутые* эксплантаты экспериментальной группы, Т – *тянутые* эксплантаты экспериментальной группы, ПЭ – *прикрепленные* эксплантаты, зафиксированные сразу после стимуляции прикрепления.

В экспериментальной группе, зафиксированной через 70 минут после начала эксперимента, ключевые статистические показатели плотности розеток оказались выше, чем у эксплантатов, зафиксированных через 40 минут. Для *нетянутых* эксплантатов ($n = 13$ шт) минимальное значение плотности розеток не

изменилось, но выросло значение максимума до 33 шт/мм². Среднее и дисперсия также были возросли: до 16,8 шт/мм² и 60 соответственно. В *тянутых* эксплантатах (n = 17 шт) минимум составил 7 шт/мм², а максимум – до 21 шт/мм², значения средних и дисперсии - 16 шт/мм² и 13 соответственно. Согласно критерию Шапиро-Уилка, обе выборки имели нормальное распределение (Рис. 19), поэтому мы также использовали U критерий Манна-Уитни для сравнения средних и F-тест для сравнения выборочных дисперсий. Среднее значение плотности розеток не отличалось между *тянутыми* и *нетянутыми* (U = 148, p-значение = 0,12) но статистически значимо различались дисперсии (F = 4,4, p-значение = 0,03 при критическом значении F-статистики = 2,42).

Средние значения плотности розеток в обоих экспериментальных группах статистически достоверно отличалось от таковых у *прикрепленных* эксплантатах (контрольной группе) (p < 0.05 во всех четырёх случаях, см. Рис. 20, ПЭ).

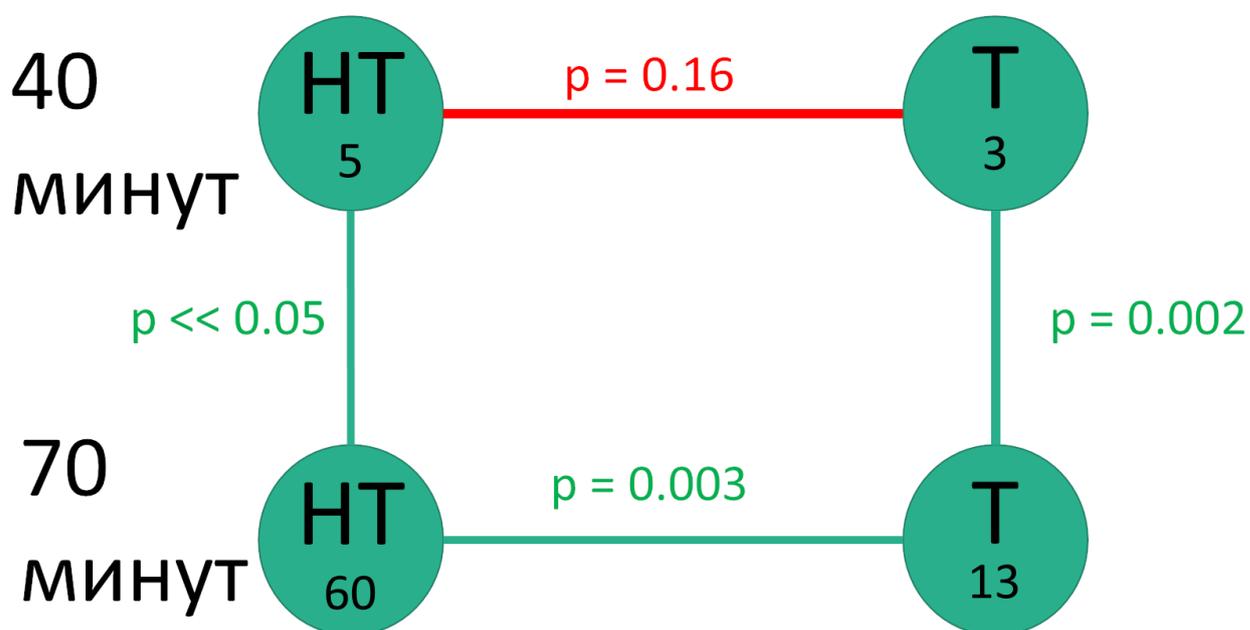


Рис. 21 Сравнение выборочных дисперсий плотности клеточных розеток в эксплантатах крыши бластоцеля. Приведены значения дисперсий плотности клеточных розеток и p-значения для F-статистики. Красные линии означают отсутствие достоверного различия, зеленые – наличие достоверного различия выборочных дисперсий. HT - *нетянутые* эксплантаты экспериментальной группы, T – *тянутые* эксплантаты экспериментальной группы.

При сравнении экспериментальных групп между собой (т.е. *нетянутых*, зафиксированных через 40 минут, с *нетянутыми*, зафиксированными через 70 минут, и аналогично для *тянутых*), были обнаружены достоверные различия между группами: и средние (Рис. 20), и дисперсии (Рис. 21) статистически значимо отличались и в случае *нетянутых* ($U = 28$ (p -значение = 0,0015), $F = 11,8$, p -значение = 0,00006), и в случае *тянутых* ($U = 3$ (p -значение = 0,00004), $F = 4,55$, p -значение = 0,0023).

Т. е., за время эксперимента средние значения плотности клеточных розеток статистически значимо увеличиваются как у *нетянутых*, так и у *тянутых* эксплантатов. Однако, изменчивость плотности клеточных розеток у *нетянутых* эксплантатов возрастает больше, чем у *тянутых*, и статистически значимо перестаёт отличаться от таковой в супрабластопоральной области интактных эмбрионов ($F = 1,12$, p -значение = 0,43).

Анализ пространственно-временной динамики смещений клеток

Мы также исследовали перегруппировки клеток в *тянутом* эксплантате *in vivo* ($n = 1$). За время съёмки эксплантат изменил свою форму (Рис. 15Г''', стрелки). Мы не можем доказательно говорить о роли перегруппировок в этом процессе, так как наблюдали только единичные розетки (Рис. 15Г, увеличенный фрагмент, выделенный рамкой «пунктир с точкой», центр розетки обозначен розовой точкой).

Гораздо больший вклад в изменение формы эксплантата вносила направленная миграция клеток в периферической зоне. Периферические 4-5 рядов клеток эксплантата осуществляли миграцию в радиальном направлении, т.е. вдоль оси, соединяющей центр эксплантата с периферией (Рис. 15Г''', стрелки). При этом, наиболее активно процесс миграции протекал в области границ эксплантата, ориентированных перпендикулярно направлению растяжения. Участок такой границы выделен на Рис. 15Г пунктирной рамкой. Миграция клеток, расположенных вдоль этих границ, привела к их смещению примерно на 35-60 мкм вдоль оси растяжения (Рис. 22А'''; граница эксплантата в конце съёмки

показана пунктирной линией). 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. 15Г, фрагмент, выделенный сплошной рамкой; Рис. 22Б-Б'''). Таким образом, миграция клеток и смещение границы эксплантата преимущественно происходила в направлении растяжения эксплантата.

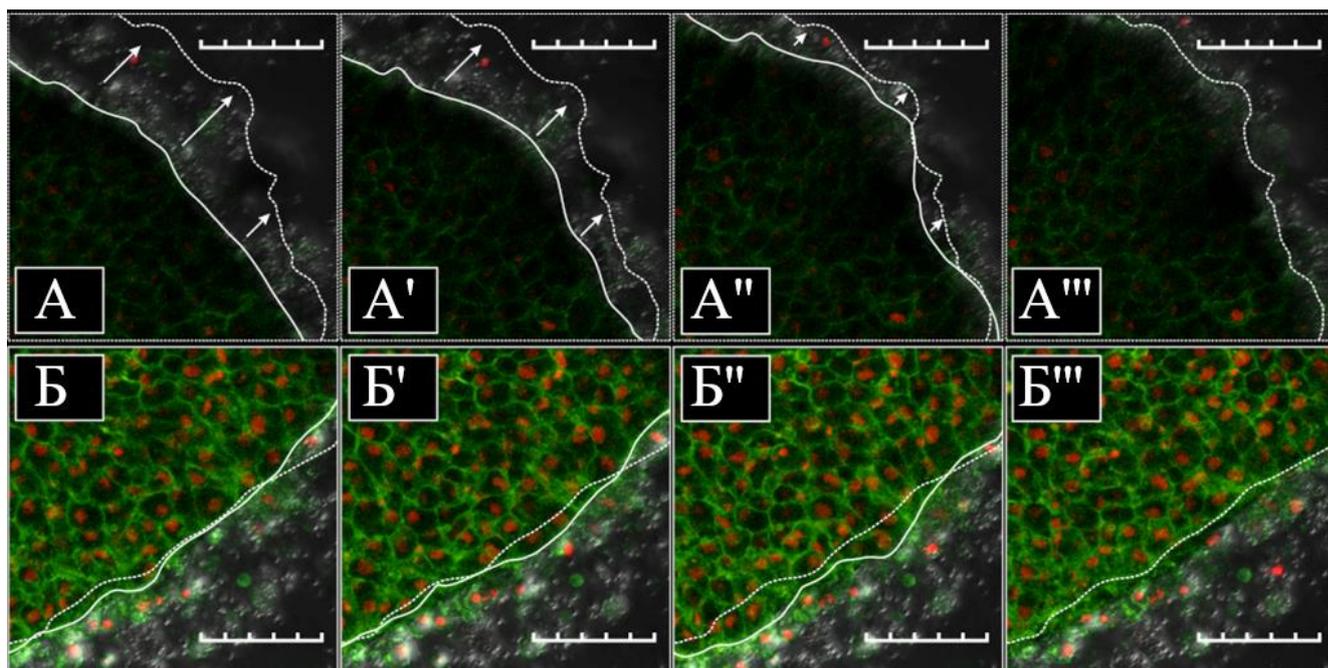


Рис. 22 Региональные различия в активности направленного движения клеток. Прижизненное маркирование мембран и ядер с помощью GAP43-GFP (зелёный) и H2B-RFP (красный) соответственно. За время цейтраферной съёмки граница эксплантата, ориентированная перпендикулярно направлению растяжения, сместилась на расстояние от 35 до 60 мкм (А-А'''), в то время как границы, ориентированные параллельно направлению растяжения практически не сместились (Б-Б'''). (А-А''') Положение границы эксплантата, ориентированной перпендикулярно направлению растяжения: (А) – сразу после 13-14% растяжения эксплантата, (А') – через 19 минут после окончания растяжения, (А'') – через 39 минут после окончания растяжения, (А''') – через 59 минут после окончания растяжения; сплошная линия – текущее положение границы эксплантата, пунктирная линия – положение границы эксплантата в конце съёмки, стрелки – направление движения границы эксплантата. (Б-Б''') Положение границы эксплантата, ориентированной параллельно направлению растяжения: (Б) – сразу после 13-14% растяжения эксплантата, (Б') – через 19 минут после окончания растяжения, (Б'') – через 39 минут после окончания растяжения, (Б''') – через 59 минут после окончания растяжения; обозначения те же, что и в (А). Масштабный отрезок: (А) и (Б) 100 мкм.

Обсуждение

Данную работу можно условно разделить на два логических блока. В первом блоке мы провели исследование роли механических сил в интактных эмбрионах. Во втором – экспериментально исследовали влияние механических сил на перегруппировки клеток в эксплантатах ткани.

Исследование роли механических сил в регуляции перегруппировок клеток в нормальном развитии

Нам удалось продемонстрировать что в области эмбриона, характеризующихся бóльшими значениями механических напряжений, частота встречаемости клеточных розеток достоверно выше. Так, число клеточных перегруппировок через формирование розеток оказалась выше в супрабластопоральной области, чем в крыше бластоцеля. Преобладание перегруппировок клеток через образование розеток также может определяться и пространственной локализацией механических сил. Так как ключевым морфогенетическим процессом в супрабластопоральной области является инволюция материала мезодермы и, впоследствии, конвергентная интеркаляция инволюировавшей мезодермы, механические напряжения в этой области преимущественно ориентированы вдоль антериопостериорной оси зародыша [5]. В то же время, в крыше бластоцеля радиальная интеркаляция глубоких клеток приводит к изотропной, т.е. одинаковой во всех направлениях, деформации эпизктодермального слоя. Это вызывает увеличение площади апикальной поверхности клеток эпизктодермы при одновременном уменьшении толщины клеточного слоя [34]. Предполагается, что такое поведение клеток отражает напряженное состояние ткани и является следствием упругого ответа: если нарушить целостность базолатеральных контактов между клетками с помощью ЭДТА, площадь апикальной поверхности клеток сокращается в течение нескольких минут, т.е. ткань релаксирует существующие в ней напряжения [41]. Схожее поведение фрагментов эпизктодермы наблюдается и при надсечении ткани *in vivo*, при этом толщина эпизктодермального слоя увеличивается до

значений, близких к толщине эпизктодермы в бластуле, когда движения радиальной интеркаляции ещё не начались. Такое изотропное распределение механических сил в крыше бластоцеля препятствует формированию выделенного направления, необходимого для дальнейшего распада розеток. Одновременно, в супрабластопоральной области пространственное анизотропия механических напряжений создаёт условия для распада розеток в антерио-постериорном направлении. Наши наблюдения подтверждают это предположение: нам удалось зафиксировать *in vivo* процесс распада трёх клеточных розеток, и в каждом случае формирующиеся в ходе распада границы отклонялись от антериопостериорной оси эмбриона не более, чем на $8,6^\circ$.

Чтобы установить, существует ли зависимость между величиной действующей силы и активностью клеточных перегруппировок, мы охарактеризовали распределение механических напряжений внутри супрабластопоральной области. Ранее было показано, что в эпизктодерме *X. laevis* в течение длительного времени действующие силы пропорциональны возникающим деформациям ткани [41]. Поэтому для картирования механических сил мы произвели цейтраферную съёмку и измерили микродеформации в ткани. Под микродеформациями понимали изменение расстояния между геометрическими центрами контактирующих клеток за время между двумя последовательными кадрами съёмки. Чтобы не учитывать изменение расстояния между клетками в ходе перегруппировок (например, в ходе распада розеток, Рис. 14), мы подобрали такой временной интервал между кадрами, чтобы он был много меньше продолжительности перегруппировок клеток в эпизктодерме *X. laevis* [11].

Оказалось, что внутри супрабластопоральной области строгая зависимость между величиной микродеформаций и числом клеток, вовлечённых в перегруппировки, отсутствует. Так, наиболее медиальный (т.е. близкий к центральной линии) регион супрабластопоральной области (регион 3 на Рис. 13В), характеризуется достоверно более высокими средними значениями

микрдеформаций по сравнению с соседними регионами и, одновременно, достоверно более высокими значениями эксцентриситета. Но, при этом, корреляционный анализ Спирмена не показал четкой зависимости ни между средними значениями этих величин в регионе 3, ни между другими статистическими показателями. При этом, в прилежащем к нему более латеральном регионе супрабластопоральной области (регион 2 на Рис. 13В) прослеживается корреляционная зависимость между величиной микрдеформаций и активностью перегруппировок клеток. Подсчет числа розеток позволяет сделать следующее предположение. Так как наибольшее число розеток зарегистрировано именно в регионе 3 (8 из 12 зарегистрированных), их перегруппировки приводят к более быстрому сбросу деформаций по сравнению с другими регионами. При этом меньшее количество розеток в регионе 2 также достаточно для сброса деформаций, но более медленного, из-за чего корреляцию между перегруппировками клеток и микрдеформациями удаётся проследить. Это позволяет предположить, что существует пороговое значение числа розеток, при котором можно выявить корреляционную связь между количеством клеточных перегруппировок и показателями, характеризующими механическую силу.

Другим интересным результатом является отрицательная корреляция средних значений микрдеформаций со средними дисперсией и коэффициентом вариации эксцентриситета. Возможные клеточные механизмы этого явления мы обсудим в следующем разделе.

Экспериментальное исследование роли механических сил в регуляции перегруппировок клеток

Второй блок данной работы включает в себя эксперименты по контролируемому одноосевому растяжению эксплантатов крыши бластоцеля.

Если изотропный характер механических напряжений в крыше бластоцеля при нормальном развитии препятствует направленному распаду розеток, то одноосевое растяжение эксплантата должно привести к возникновению в нём механических напряжений, сонаправленных оси растяжения, и сформировать

преимущественное направление для распада розеток. В результате мы будем наблюдать увеличение количества розеток у *тянутых* эксплантатов по сравнению с *нетянутыми*, аналогично тому, как плотность розеток в супрабластопральной области превышает таковую в интактной крыше бластоцеля. Чтобы полученные результаты были применимы к нормальному развитию, мы выбрали скорость деформации близкую к таковой в нормальном развитии [21].

Изоляция фрагмента крыши бластоцеля привела к снижению в нем плотности розеток. Последующее одноосевое растяжение эксплантатов не привело к увеличению количества клеточных розеток. Среднее число розеток увеличивалось с течением времени и в *тянутых*, и в *нетянутых* эксплантатах. При этом среднее значение плотности розеток и в *тянутых*, и в *нетянутых* эксплантатах было достоверно меньше такового в интактном эмбрионе. Интересно, что дисперсия плотности клеточных розеток у *тянутых* эксплантатов было достоверно ниже через час после растяжения, чем у *нетянутых*. Таким образом, хотя количество розеток оставалось тем же, вариабельность числа образующихся розеток снизилась. Это косвенно подтверждают значения минимума и максимума. У эксплантатов, зафиксированных через 40 минут после начала эксперимента, эти значения практически идентичны. При этом у *тянутых* эксплантатов, зафиксированных через 70 минут, значение минимума незначительно выше, чем у *нетянутых* (7 шт/мм² для *тянутых* и 4 шт/мм² для *нетянутых*), а значение максимума ниже (22 шт/мм² для *тянутых* и 33 шт/мм² для *нетянутых*). Этот результат схож с данными об отрицательной корреляции средних микродеформаций в ткани со средними дисперсией и коэффициентом вариации эксцентриситета, полученными нами на интактных эмбрионах. Эти результаты означают, что с ростом деформации (а, значит и механической силы), изменчивость плотности розеток в ткани снижается. Предположительно, этот эффект может быть связан с участием базолатеральных клеточных выростов в переупаковках через розетки [69]. Для клеток мезэнтодермы было продемонстрировано, что действие механической силы способствует

формированию более стабильных ламеллоподий, т.е. характеризующихся большим временем существования. При этом вариабельность ориентации формирующихся ламеллоподий снижается [66, 74]. Похожий механизм может иметь место и при формировании розеток. В этом случае действие механической силы может стабилизировать формирующиеся базолатеральные выросты.

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.

В качестве объекта исследования для проверки этой гипотезы мы выбрали эмбриона шпорцевой лягушки - *Xenopus laevis* - у которого на стадии гастрюлы происходят активные морфогенетические процессы, сопровождающиеся перегруппировками клеток [34, 79]. Выбор объекта был также обусловлен тем, что для гастрюлы *X. laevis* на качественном уровне описано пространственное распределение механических сил [5]. Известно, что наиболее механически напряжённым регионом эмбриона на стадии гастрюлы является супрабластопоральная область, материал которой вовлечён в активные инволюционные движения, обеспечивающие интернализацию материала хордомезодермы. Для этой зоны показано наличие градиента механических напряжений, направленного к анимальному полюсу - напряжение в ткани значительно снижается в области крыши бластоцеля.

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 2). Таким образом, мы численно 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 4). Именно этот регион, по сравнению с латеральными регионами, наиболее активно вовлечен в процесс инволюции (Рис. 13В и Д, Регион 3). 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. 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 патологий.

Выводы

1. Частота встречаемости клеточных перегруппировок достоверно выше в регионе, характеризующимся большими значениями механических напряжений. Так, в супрабластопоральной 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 супрабластопоральной области гастролы *Xenopus laevis*, характеризующимся высокими скоростями и сонаправленностью движений клеток, и снижается в латеральных регионах. Таким образом, распределение механических напряжений в супрабластопоральной 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 супрабластопоральной 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.

Благодарности

- Автор диссертации выражает искреннюю благодарность научному руководителю, Юлии Александровне Краус за руководство и наставления;
- Станиславу Валерьевичу Кремнёву за помощь в синтезе РНК;
- Наталье Николаевне Лучинской и Илье Владимировичу Володяеву за поддержку и наставления;
- Илье Владимировичу Володяеву, Михаилу Михайловичу Мойсеновичу и ООО «Троицкий инженерный центр» за помощь в реализации проекта установки для растяжения клеточных подложек;
- Доктору Dietmar Gradl за любезно предоставленные плазмиды GAP43-GFP-pCS2+ и H2B-RFP-pCS2+.

Список литературы

1. Azioune A. [и др.]. Robust method for high-throughput surface patterning of deformable substrates // *Langmuir*. 2011. № 12 (27). С. 7349–7352.
2. Belousov L. V. [и др.]. Mechanical Stresses in Embryonic Tissues: Patterns, Morphogenetic Role, and Involvement in Regulatory Feedback // *International Review of Cytology*. 1994. № С (150). С. 1–34.
3. Belousov L. V. Morphomechanics of development / L. V. Belousov, 2015. 1–195 с.
4. Belousov L. V. [и др.]. Local and global dynamics in collective movements of embryonic cells // *BioSystems*. 2018. № September (173). С. 36–51.
5. Belousov L. V., Dorfman J. G., Cherdantzev V. G. Mechanical stresses and morphological patterns in amphibian embryos // *Journal of Embryology and Experimental Morphology*. 1975. № 3 (34). С. 559–574.
6. Belousov L. V., Louchinskaia N. N., Stein A. A. Tension-dependent collective cell movements in the early gastrula ectoderm of *Xenopus laevis* embryos // *Development Genes and Evolution*. 2000. № 2 (210). С. 92–104.
7. Bertet C., Sulak L., Lecuit T. Myosin-dependent junction remodelling controls planar cell intercalation and axis elongation // *Nature*. 2004. № 6992 (429). С. 667–671.
8. Bjerke M. A. [и др.]. FAK is required for tension-dependent organization of collective cell movements in *Xenopus* mesendoderm // *Developmental Biology*. 2014. № 2 (394). С. 340–356.
9. Blankenship J. T. [и др.]. Multicellular Rosette Formation Links Planar Cell Polarity to Tissue Morphogenesis // *Developmental Cell*. 2006. № 4 (11). С. 459–470.
10. Bredov D. V., Luchinskaya N. N., Volodyaev I. V. Introducing a Method for Controllable Deformation of Embryonic Tissues to Study Mechanodependent Cell Movements // *Russian Journal of Developmental Biology*. 2022. № 2 (53). С. 121–127.
11. Butler M. T., Wallingford J. B. Spatial and temporal analysis of PCP protein

- dynamics during neural tube closure // *eLife*. 2018. (7). С. 1–23.
12. Campinho P. [и др.]. Tension-oriented cell divisions limit anisotropic tissue tension in epithelial spreading during zebrafish epiboly // *Nature Cell Biology*. 2013. № 12 (15). С. 1405–1414.
13. Chien Y. H. [и др.]. Mechanical strain determines the axis of planar polarity in ciliated epithelia // *Current Biology*. 2015. № 21 (25). С. 2774–2784.
14. Damm E. W., Winklbauer R. PDGF-A controls mesoderm cell orientation and radial intercalation during *Xenopus* gastrulation // *Development*. 2011. № 3 (138). С. 565–575.
15. Dassow M. von, Strother J. A., Davidson L. A. Surprisingly simple mechanical behavior of a complex embryonic tissue // *PLoS ONE*. 2010. № 12 (5).
16. Davidson L. A. [и др.]. Mesendoderm extension and mantle closure in *Xenopus laevis* gastrulation: Combined roles for integrin $\alpha 5\beta 1$, fibronectin, and tissue geometry // *Developmental Biology*. 2002. № 2 (242). С. 109–129.
17. Davidson L. A. *Embryo Mechanics. Balancing Force Production with Elastic Resistance During Morphogenesis* / L. A. Davidson, 1-е изд., Elsevier Inc., 2011. 215–241 с.
18. Dumortier J. G. [и др.]. Collective mesendoderm migration relies on an intrinsic directionality signal transmitted through cell contacts // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012. № 42 (109). С. 16945–16950.
19. Eroshkin F. M. [и др.]. Development of Methods and Techniques to Visualize Mechanical Tension in Embryos Using Genetically Encoded Fluorescent Mechanosensors // *Russian Journal of Developmental Biology*. 2018. № 6 (49). С. 362–369.
20. Evstifeeva A. Y., Kremnyov S. V., Belousov L. V. Changes in topology and geometry of the embryonic epithelium of *Xenopus* during relaxation of mechanical

- tension // *Russian Journal of Developmental Biology*. 2010. № 3 (41). С. 156–163.
21. Evstifeeva A. Y., Luchinskaia N. N., Belousov L. V. Stress-generating tissue deformations in *Xenopus* embryos: Long-range gradients and local cell displacements // *BioSystems*. 2018. № September (173). С. 52–64.
22. Evstifeeva A. Y., Luchinskaia N. N., Belousov L. V. Stress-generating tissue deformations in *Xenopus* embryos: Long-range gradients and local cell displacements // *BioSystems*. 2018. № July (173). С. 52–64.
23. Ezin A. M., Skoglund P., Keller R. The midline (notochord and notoplate) patterns the cell motility underlying convergence and extension of the *Xenopus* neural plate // *Developmental Biology*. 2003. № 1 (256). С. 101–114.
24. Forgacs G. [и др.]. Viscoelastic properties of living embryonic tissues: A quantitative study // *Biophysical Journal*. 1998. № 5 (74). С. 2227–2234.
25. Gayrard C., Borghi N. FRET-based Molecular Tension Microscopy // *Methods*. 2016. Т. 94. С. 33–42.
26. Goddard G. K., Tarannum N., Woolner S. Applying Tensile and Compressive Force to *Xenopus* Animal Cap Tissue // *Cold Spring Harbor Protocols*. 2020. № 3 (2020). С. 68–74.
27. Guillot C., Lecuit T. Mechanics of epithelial tissue homeostasis and morphogenesis // *Science*. 2013. Т. 340. № 6137. С. 1185–1189.
28. Hara Y. [и др.]. Directional migration of leading-edge mesoderm generates physical forces: Implication in *Xenopus* notochord formation during gastrulation // *Developmental Biology*. 2013. № 2 (382). С. 482–495.
29. Harding M. J., McGraw H. F., Nechiporuk A. The roles and regulation of multicellular rosette structures during morphogenesis // *Development (Cambridge)*. 2014. № 13 (141). С. 2549–2558.
30. Heller D. [и др.]. EpiTools: An Open-Source Image Analysis Toolkit for

- Quantifying Epithelial Growth Dynamics // *Developmental Cell*. 2016. № 1 (36). С. 103–116.
31. Herbomel G. [и др.]. Actomyosin-generated tension on cadherin is similar between dividing and non-dividing epithelial cells in early *Xenopus laevis* embryos // *Scientific Reports*. 2017. № February (7). С. 1–12.
32. Higashi T. [и др.]. Maintenance of the Epithelial Barrier and Remodeling of Cell-Cell Junctions during Cytokinesis // *Current Biology*. 2016. № 14 (26). С. 1829–1842.
33. Keller R., Danilchik M. Regional expression, pattern and timing of convergence and extension during gastrulation of *Xenopus laevis* // *Development*. 1988. № 1 (103). С. 193–209.
34. Keller R. E. Time-lapse cinemicrographic analysis of superficial cell behavior during and prior to gastrulation in *Xenopus laevis* // *Journal of Morphology*. 1978. № 2 (157). С. 223–247.
35. Keller R. E. The cellular basis of epiboly: An SEM study of deep-cell rearrangement during gastrulation in *Xenopus laevis* // *Journal of Embryology and Experimental Morphology*. 1980. № 1939 (VOL.60). С. 201–234.
36. Keller R. E., Schoenwolf G. C. An SEM study of cellular morphology, contact, and arrangement, as related to gastrulation in *Xenopus laevis* // *Wilhelm Roux's Archives of Developmental Biology*. 1977. № 2 (182). С. 165–186.
37. Keller R., Shih J., Sater A. The cellular basis of the convergence and extension of the *Xenopus* neural plate // *Developmental Dynamics*. 1992. № 3 (193). С. 199–217.
38. Kemkemer R. [и др.]. Cell orientation by a microgrooved substrate can be predicted by automatic control theory // *Biophysical Journal*. 2006. № 12 (90). С. 4701–4711.
39. Kim H. Y. [и др.]. Tissue mechanics drives regeneration of a mucociliated epidermis on the surface of *Xenopus* embryonic aggregates // *Nature Communications*. 2020. № 1 (11). С. 1–10.

40. Kim H. Y., Davidson L. A. Punctuated actin contractions during convergent extension and their permissive regulation by the non-canonical Wnt-signaling pathway // *Journal of Cell Science*. 2011. № 4 (124). С. 635–646.
41. Luu O. [и др.]. Large-scale mechanical properties of *Xenopus* embryonic epithelium // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011. № 10 (108). С. 4000–4005.
42. Ma X. [и др.]. Probing embryonic tissue mechanics with laser hole drilling // *Physical Biology*. 2009. № 3 (6).
43. Mansurov A. N., Stein A. A., Belousov L. V. A simple model for estimating the active reactions of embryonic tissues to a deforming mechanical force // *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology*. 2012. № 8 (11). С. 1123–1136.
44. Mongera A. [и др.]. A fluid-to-solid jamming transition underlies vertebrate body axis elongation // *Nature*. 2018. № 7723 (561). С. 401–405.
45. Moore S. W., Keller R. E., Koehl M. A. R. The dorsal involuting marginal zone stiffens anisotropically during its convergent extension in the gastrula of *Xenopus laevis* // *Development*. 1995. № 10 (121). С. 3131–3140.
46. Morita H. [и др.]. Cell Movements of the deep layer of non-neural ectoderm underlie complete neural tube closure in *Xenopus* // *Development*. 2012. № 8 (139). С. 1417–1426.
47. Murray J. D. *Mathematical Biology biomedical applications* / J. D. Murray, 2003. 814 с.
48. Nagatomi J. *Mechanobiology Handbook, Second Edition* / J. Nagatomi, CRC Press, 2018. 704 с.
49. Nestor-Bergmann A. [и др.]. Decoupling the Roles of Cell Shape and Mechanical Stress in Orienting and Cueing Epithelial Mitosis // *Cell Reports*. 2019. № 8 (26). С. 2088-2100.e4.

50. Nieuwkoop P. D., Faber J. Normal Table of *Xenopus Laevis* (Daudin) // *Copeia*. 1958. T. 1958. № 1. С. 65.
51. Nishimura T., Honda H., Takeichi M. Planar Cell Polarity Links Axes of Spatial Dynamics in Neural-Tube Closure // *Cell*. 2012. № 5 (149). С. 1084–1097.
52. Pfister K. [и др.]. Molecular model for force production and transmission during vertebrate gastrulation // *Development (Cambridge)*. 2016. № 4 (143). С. 715–727.
53. Ramos J. W., DeSimone D. W. *Xenopus* embryonic cell adhesion to fibronectin: Position-specific activation of RGD/synergy site-dependent migratory behavior at gastrulation // *Journal of Cell Biology*. 1996. № 1 (134). С. 227–240.
54. Rauzi M. [и др.]. Nature and anisotropy of cortical forces orienting *Drosophila* tissue morphogenesis // *Nature Cell Biology*. 2008. № 12 (10). С. 1401–1410.
55. Rauzi M. Cell intercalation in a simple epithelium: Cell intercalation // *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2020. № 1809 (375). С. 0–2.
56. Reffay M. [и др.]. Orientation and polarity in collectively migrating cell structures: Statics and dynamics // *Biophysical Journal*. 2011. № 11 (100). С. 2566–2575.
57. Rozario T. [и др.]. The physical state of fibronectin matrix differentially regulates morphogenetic movements in vivo // *Developmental Biology*. 2009. № 2 (327). С. 386–398.
58. Serra-Picamal X. [и др.]. Mechanical waves during tissue expansion // *Nature Physics*. 2012. № 8 (8). С. 628–634.
59. Serwane F. [и др.]. In vivo quantification of spatially varying mechanical properties in developing tissues // *Nature Methods*. 2017. № 2 (14). С. 181–186.
60. Shindo A. Models of convergent extension during morphogenesis // *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*. 2018. № 1 (7). С. 1–17.
61. Shindo A. [и др.]. PCP-dependent transcellular regulation of actomyosin oscillation

facilitates convergent extension of vertebrate tissue // *Developmental Biology*. 2019. № 2 (446). С. 159–167.

62. Shindo A., Wallingford J. B. PCP and septins compartmentalize cortical actomyosin to direct collective cell movement // *Science*. 2014. № 6171 (343). С. 649–652.

63. Sive H. L., Grainger R. M., Harland R. M. Early Development of *Xenopus Laevis*: A Laboratory Manual / H. L. Sive, R. M. Grainger, R. M. Harland, CSHL Press, 2000. 249–297 с.

64. Skoglund P. [и др.]. Convergence and extension at gastrulation require a myosin IIB-dependent cortical actin network // *Development*. 2008. № 14 (135). С. 2435–2445.

65. Solnica-Krezel L., Sepich D. S. Gastrulation: Making and shaping germ layers // *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 2012. № 1 (28). С. 687–717.

66. Sonavane P. R. [и др.]. Mechanical and signaling roles for keratin intermediate filaments in the assembly and morphogenesis of *Xenopus* mesendoderm tissue at gastrulation // *Development (Cambridge)*. 2017. № 23 (144). С. 4363–4376.

67. Stooke-Vaughan G. A., Davidson L. A., Woolner S. *Xenopus* as a model for studies in mechanical stress and cell division // *Genesis*. 2017. Т. 55. № 1–2. С. 1–11.

68. Streichan S. J. [и др.]. Global morphogenetic flow is accurately predicted by the spatial distribution of myosin motors // *eLife*. 2018. (7).

69. Sun Z. [и др.]. Basolateral protrusion and apical contraction cooperatively drive *Drosophila* germ-band extension // *Nature Cell Biology*. 2017. № 4 (19). С. 375–383.

70. Trichas G. [и др.]. Multi-Cellular Rosettes in the Mouse Visceral Endoderm Facilitate the Ordered Migration of Anterior Visceral Endoderm Cells 2012. № 2 (10).

71. Wallingford J. B. [и др.]. Dishevelled controls cell polarity during *Xenopus* gastrulation // *Nature*. 2000. № 6782 (405). С. 81–85.

72. Wang J. H. C. [и др.]. Specificity of endothelial cell reorientation in response to cyclic mechanical stretching // *Journal of Biomechanics*. 2001. № 12 (34). С. 1563–

1572.

73. Weaire D., Rivier N. Soap, cells and statistics - Random patterns in two dimensions // *Contemporary Physics*. 2009. № 1 (50). С. 199–239.
74. Weber G. F., Bjerke M. A., DeSimone D. W. A Mechanoresponsive Cadherin-Keratin Complex Directs Polarized Protrusive Behavior and Collective Cell Migration // *Developmental Cell*. 2012. № 1 (22). С. 104–115.
75. Williams M. [и др.]. Distinct apical and basolateral mechanisms drive planar cell polarity-dependent convergent extension of the mouse neural plate // *Developmental Cell*. 2014. № 1 (29). С. 34–46.
76. Yamashita S. [и др.]. Wide and high resolution tension measurement using FRET in embryo // *Scientific Reports*. 2016. № November 2015 (6). С. 1–8.
77. Yu J. C., Fernandez-Gonzalez R. Local mechanical forces promote polarized junctional assembly and axis elongation in *Drosophila* // *eLife*. 2016. № JANUARY2016 (5). С. 1–15.
78. Бредов Д. В., Володяев И. В., Лучинская Н. Н. Морфометрическое исследование пространственно-временной динамики деформаций эмбриональной ткани в ходе гаструляции *Xenopus laevis* // *Онтогенез*. 2021. № 5 (52). С. 317–328.
79. Евстифеева А. Ю., Кремнёв С. В., Белоусов Л. В. Изменения Топологии И Геометрии Эмбриональных Эпителиев Шпорцевой Лягушки При Релаксации Механических Натяжений // *Онтогенез*. 2010. № 3 (41). С. 190–198.
80. Ильюшин А. А., Ленской В. С. Сопротивление материалов: уч. пособие / А. А. Ильюшин, В. С. Ленской, Москва: Государственное издательство физико-математической литературы, 1959. 373 с.
81. Матвеев А. Н. Механика и теория относительности: Учеб. для студентов вузов / А. Н. Матвеев, 2003. 2003–2432 с.
82. Петкевич В. В. Теоретическая механика: Учебное пособие / В. В. Петкевич,

Наука. Гл. ред. физ.-мат. лит., 1981.

83. Работнов Ю. Н. Механика деформируемого твердого тела: учебное пособие / Ю. Н. Работнов, Наука. Гл. ред. физ.-мат. лит., 1988.

84. Трошина Т. Г., Глаголева Н. С., Белоусов Л. В. Статистическое исследование быстрых механозависимых клеточных движений в деформированных эксплантатах эмбриональных тканей шпорцевой лягушки. // Онтогенез. 2011. № 5 (42). С. 346–356.