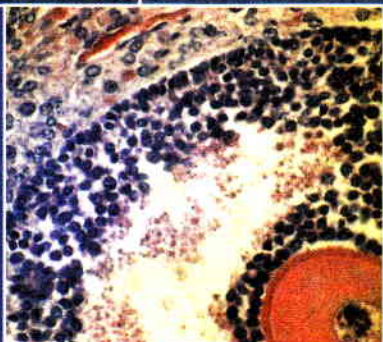


Высшее профессиональное образование

ПРАКТИКУМ ПО ЭМБРИОЛОГИИ

Учебное пособие



Естественные
науки


ACADEM'A

ПРАКТИКУМ ПО ЭМБРИОЛОГИИ

Под редакцией проф. **В. А. ГОЛИЧЕНКОВА**
и доц. **М. Л. СЕМЕНОВОЙ**

*Рекомендовано
Учебно-методическим объединением по классическому
университетскому образованию в качестве учебного пособия
для студентов университетов, обучающихся по направлению
510600 «Биология» и биологическим специальностям*

УДК 611-013(075.8)

ББК 28.03я73

П69

Авторы:

В. А. Голиченков, Е. А. Иванов, Н. Н. Лучинская, И. В. Неклюдова,
Е. Н. Никерясова, М. Л. Семенова, Л. А. Слепцова, М. З. Чунаева,
Н. В. Языкова

Рецензенты:

чл.-кор. РАН, д-р биол. наук, проф. *Л. И. Корочкин*;
д-р биол. наук *Ю. К. Доронин* (зав. сектором клеточной биологии
развития и старения биологического ф-та МГУ им. М. В. Ломоносова)

Практикум по эмбриологии: Учеб. пособие для студ. уни-
верситетов / В. А. Голиченков, Е. А. Иванов, Н. Н. Лучин-
ская и др.; Под ред. В. А. Голиченкова, М. Л. Семеновой. —
М.: Издательский центр «Академия», 2004. — 208 с., [8] с. цв.
ил.: ил.

ISBN 5-7695-1330-6

Пособие включает 12 практических занятий, посвященных изуче-
нию одного из ранних этапов индивидуального развития животных (гаме-
тогенез, оплодотворение, дробление, гастрюляция, нейруляция, ос-
новы органогенеза). Каждому занятию предшествует теоретическое вве-
дение, в котором отражены последние достижения биологии развития
и эмбриологии. Книга иллюстрирована многочисленными схемами и
оригинальными фотографиями, что хорошо дополняет и делает более
понятным теоретический материал.

Для студентов университетов, обучающихся по биологическим спе-
циальностям.

УДК 611-013(075.8)

ББК 28.03я73

ISBN 5-7695-1330-6

© Коллектив авторов, 2004

© Издательский центр «Академия», 2004

ВВЕДЕНИЕ

Эмбриология изучает индивидуальное развитие многоклеточ-
ных организмов. Несмотря на то что развитие организма не закан-
чивается эмбриональным периодом, по причинам исторического
приоритета сохранение названия «эмбриология» для науки об
индивидуальном развитии оправдано.

Эмбриология занимает особое положение среди биологических
наук. С достаточной мерой условности биологические науки мож-
но разделить на две группы:

науки по объекту исследования (вирусология, микробиология,
зоология, ботаника и т. п.);

науки по уровню изучения живого (биофизика, молекулярная
биология, физиология и т. п.).

Эмбриология по-своему необходима для всех этих направлений
так же, как и сами они для эмбриологии. Для первых эмбриология
обеспечивает знание закономерностей развития их объектов в он-
тогенезе, в то же время это составляет предмет сравнительной эм-
бриологии, позволяя выделить общее и особенное в онтогенезе. Для
вторых эмбриология предоставляет самые интересные модельные
объекты. Благодаря успехам молекулярной биологии, молекуляр-
ной генетики, цитологии на эмбриональных моделях решаются
сложные и фундаментальные проблемы биологии, такие, как функ-
ция генов в развитии и регуляции генной экспрессии, индукцион-
ные взаимодействия, проблемы регенерации, клеточной диффе-
ренцировки и трансдифференцировки, программированной клеточ-
ной гибели и старения. Из лабораторий результаты этих работ вне-
дряются во все области биотехнологической практики (трансге-
ноз, клонирование и т. п.). Таким образом, вторая группа биологи-
ческих дисциплин вооружает эмбриологию современными метода-
ми изучения онтогенеза, превращая традиционную эмбриологию
в современную биологию развития. Знание закономерностей регу-
ляции онтогенеза и условий его изменения необходимо для пони-
мания механизмов эволюции и управления онтогенезом.

В исследовательской практике биологии развития, как и в не-
которых других биологических науках, используется принцип ре-
дукции и подобия, согласно которому закономерности развития
одного модельного объекта допустимо трактовать расширительно
и применять к другим. Поэтому в практике работы кафедры был

отобран ряд объектов, удобных для изучения общих закономерностей онтогенеза.

Современные исследования немислимы без знания объекта, его морфологии, гистологического строения и тонкой структуры. Знание одного конкретного объекта дает исследователю возможность постановки научной задачи, а знание многих объектов — возможность сравнительного анализа, особенно актуального в современной науке.

Крупные размеры эмбриональных клеток, а также их ядер в начальные периоды развития сделали эмбриональные объекты незаменимыми для ряда физиологических, молекулярно-биологических и биофизических исследований. Так, ооциты и зиготы *Xenopus* имеют размеры 1,2—1,5 мм, а бластомеры в период дробления — 300—50 мкм, что делает их исключительно удобными для применения микроэлектродных техник и микроинъекций в цитоплазму и даже в ядро.

Сложность эмбриональных моделей связана с тем, что состояние (морфология, гистология, биохимия) как целого эмбриона, так и его органов и тканей постоянно изменяются и зависят от стадии развития, на которой этот эмбрион находится. Об эмбриональном объекте в большей степени, чем о взрослом организме, можно сказать, что его исследование — это изучение не столько объекта, сколько процесса.

Основы эмбриологического рисунка

Современные способы получения изображений биологических объектов становятся все более привычными для специалистов-биологов. Так, классический фотопроцесс вытесняется методами видеомикроскопии, объект исследования все чаще фотографируют с помощью цифровых фотокамер высокого разрешения; компьютерные методы обработки цифровых изображений не только облегчают работу исследователя, но и дают много новых возможностей для анализа результатов эксперимента. Однако несмотря на все технические достижения, ценность биологического рисунка не пропадает, так как он является не просто упрощенным изображением объекта, а результатом анализа, выполненного самым сложным на сегодняшний день анализатором изображений — человеческим мозгом. Студентам важно заниматься именно *зарисовкой* биологических объектов: выполняя эту работу, они внимательно всматриваются в препарат и замечают такие детали строения, на которые не всегда обратили бы внимание при беглом просмотре препарата.

Рисунок в течение нескольких столетий был одним из основных инструментов в руках исследователей и фактически единствен-

ным способом регистрации собственных наблюдений. В результате на грани науки и изобразительного искусства сформировалась традиция *научного рисунка*, частью которой является *биологический рисунок*. В 1930 г. русский поэт и художник Максимилиан Волошин писал: «Точно так же, как художник не имеет сотрудничества ученого, точно так же и ученый не имеет сейчас часто необходимого орудия эксперимента и анализа — отточенного тонко карандаша, потому что научный рисунок — художественная дисциплина, которую еще не знает современная живописная школа». В настоящее время большинство художников — создателей современного биологического рисунка — являются по образованию биологами. Студент, имеющий художественные способности, может стать мастером биологического рисунка и даже профессиональным иллюстратором научных и научно-популярных работ. Но даже те, кто не находит у себя такого таланта, могут научиться рисовальной технике, с самого начала следуя достаточно простым рекомендациям, которые приведены в этой главе.

Основные требования к научному рисунку — информативность, четкость, лаконичность и, что самое главное, научная достоверность. В биологическом рисунке важна также *четкая прорисовка* всех деталей, а хорошее художественное оформление служит дополнением к тщательно выполненной работе и делает рисунок более наглядным.

Прежде чем приступать к рисунку, надо понять общее строение эмбриологического объекта, расположение клеточных пластов и зачатков органов. В классическом эмбриологическом рисунке принято изображать ооциты и эмбрионы на стадиях дробления анимальным полюсом вверх — для видов, имеющих телолоцитарное расположение желтка в ооците (рис. 1, А). На последую-

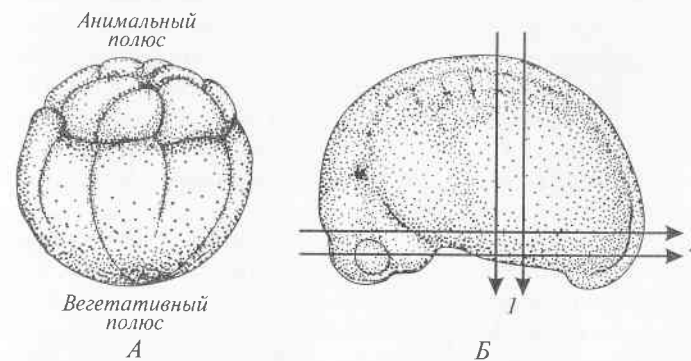


Рис. 1. Примеры эмбриологического рисунка:

А — рекомендуемое положение анимального и вегетативного полюсов на рисунке; В — поперечная (1) и фронтальная (2) плоскости прохождения гистологических срезов эмбриональных объектов; сагиттальный срез проходит в плоскости листа

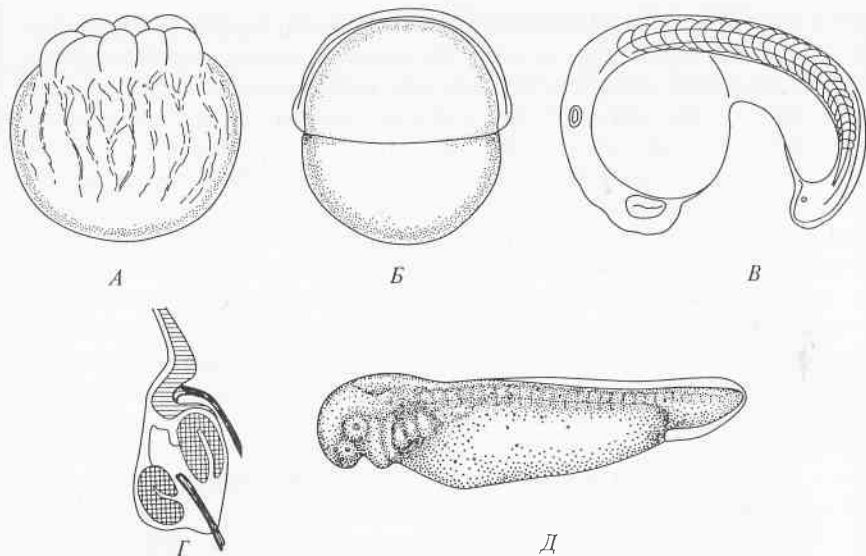


Рис. 2. Примеры эмбриологического рисунка:

А — дробление у рыб (вьюн, 8 бластомеров); Б — гастрולה вьюна; В — вьюн (на стадии сомитогенеза); Г — основание антенны личинки хирономуса; Д — личинка аксолотля

ших стадиях развития (начиная с ранней гастролы) принято указывать расположение дорсальной и вентральной сторон зародыша, а на более поздних стадиях развития (начиная с нейрулы) рисовать эмбриологические объекты дорсальной стороной вверх (рис. 1, Б).

Бумагу для рисунка лучше всего выбирать максимально белую, плотную, гладкую и не мелованную. Начинать рисунок нужно с прорисовки общих контуров объекта, при этом линии замкнутых контуров должны быть сплошными и не обрываться. Следует избегать повторного обведения контура. Так называемая «опущенность», или «волосатость», линий не только делает рисунок неаккуратным и менее точным, но и иногда как бы создает дополнительные несуществующие структуры.

При зарисовке объекта на ранних стадиях развития (стадии дробления и до ранней гастролы включительно), когда эмбрион состоит из небольшого числа крупных клеток, принято прорисовывать каждую клетку, обращая внимание на ее форму, размер и детали внутриклеточного строения: расположение ядер, вакуолизацию, распределение гранул пигмента и т. д. (рис. 2, А). Для более поздних стадий развития следует прорисовывать расположение клеточных пластов и зачатков, а не отдельные клетки (рис. 2, Б). При более детальной прорисовке объекта следует сразу же диф-

ференцировать линии по толщине (основные контуры рисуются более толстыми, а структурные детали — более тонкими линиями). Для этого следует либо изменять силу нажима на карандаш, либо применять для тонких линий карандаш с более тонким и твердым грифелем.

На рисунках гистологических срезов эмбриологических объектов возможно применение разных типов штриховок для выделения различных деталей строения зародыша (рис. 2, Г). Такая техника не позволяет показать детали строения зачатков и клеточных пластов, но дает возможность четко и быстро выделить значимые области.

При изображении тотальных препаратов форму и объем эмбриологического объекта часто передают с помощью особой техники рисунка, при которой контур изображения заполняется точ-

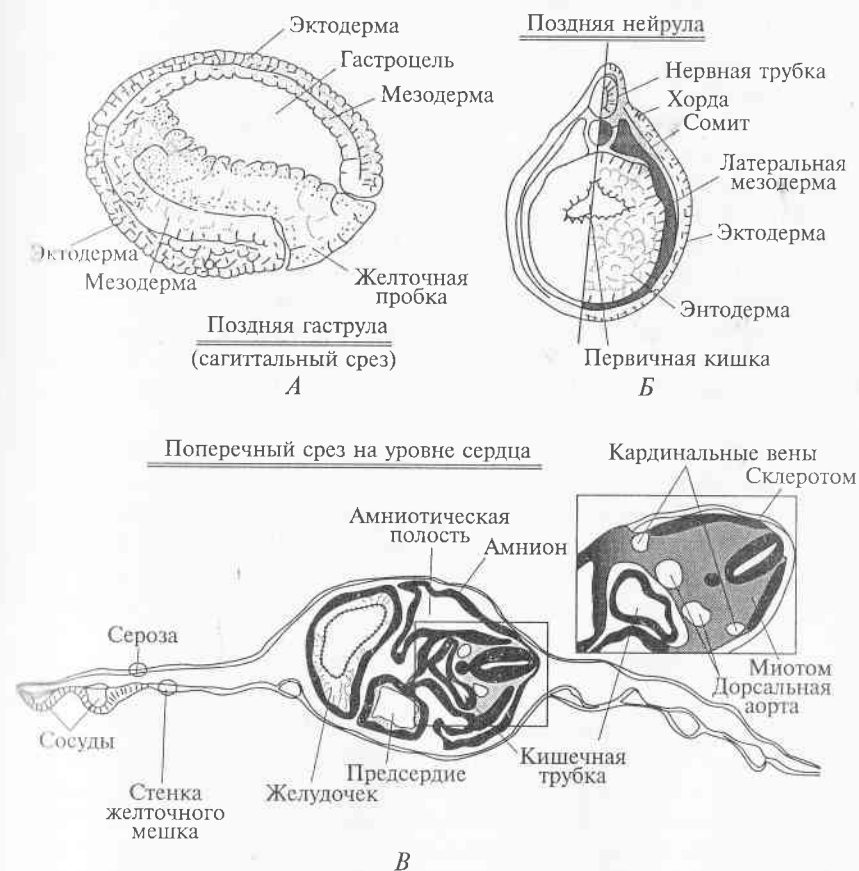


Рис. 3. Пример студенческого рисунка на практических занятиях:

А — гастрולה лягушки; Б — нейрула лягушки; В — органогенез у птиц

ками (рис. 2, Д). На те участки, где рисунок должен быть темнее, ставится много точек как можно ближе друг к другу, а там, где объект имеет более светлые области, точек ставится мало. На самые светлые области рисунка точки вообще не наносятся. Наиболее темные внутренние контуры рисунка можно выделить точками более крупного размера. Такая техника трудоемка, занимает много времени и на студенческом практикуме, как правило, не применяется, однако ее элементы могут быть использованы в рамках предлагаемого практикума при зарисовке тотальных препаратов куриных зародышей.

В заключение этого раздела дадим несколько рекомендаций для студентов, которые помогут им выполнить все рисунки за время занятия.

1. Объект, имеющий асимметричное строение (например, сагиттальный срез эмбриона), должен быть прорисован полностью (рис. 3, А).

2. Часто срезы эмбриологических объектов имеют большое количество различных деталей строения. В этом случае можно сначала сделать схематическую прорисовку объекта при малом увеличении микроскопа, а затем при большем увеличении прорисовать наиболее значимые области (рис. 3, Б).

3. При рисовании билатерально-симметричного объекта (например, поперечного среза эмбриона) можно заполнить деталями строения только половину рисунка, а вторую половину оставить в виде контурных линий (рис. 3, А, Б, В).

4. На препаратах эмбриологических объектов есть области (например, желток), где клеточные границы практически не видны или отсутствуют. Такие области лучше обозначить точками по полю, а не заштриховывать.

5. Кроме клеточных структур на препаратах встречаются и внеклеточные образования (например, оболочка оплодотворения) и полости (например, целом). В этом случае на рисунке лучше выделять штриховкой толщину клеточных и внеклеточных слоев, а полости оставлять незакрашенными.

Эмбриологические препараты

В нашем учебном пособии мы не будем касаться методов приготовления гистологических препаратов для данного практикума, так как этим вопросам посвящено немало специальных пособий и методических руководств. При проведении практикума по эмбриологии могут применяться гистологические препараты различных типов:

1. *Живой препарат.* Целый эмбрион помещают в воду или специальный физиологический раствор и используют для прижизненного наблюдения за процессами развития.

2. *Мазок.* На предметное стекло наносят каплю клеточной суспензии, после чего клетки равномерно распределяют по его поверхности с помощью специального стеклышка.

3. *Отпечаток.* Для приготовления препарата нужно прикоснуться к хорошо обезжиренному предметному стеклу кусочком ткани. В результате часть клеток прилипнет к стеклу, которые после фиксации и окраски можно исследовать под микроскопом. Этот тип гистологического препарата часто используют для изучения процессов сперматогенеза.

4. *Тотальный препарат (временный или постоянный).* Эмбрион отделяют от желтка, фиксируют и монтируют на предметном стекле. После окраски и заключения этот препарат можно исследовать под микроскопом, но только при малом увеличении (объектив $\times 8$), так как его толщина может достигать нескольких миллиметров.

5. *Гистологический срез эмбриологического объекта.* На студенческих практикумах, как правило, предлагают препараты с наклеенными единичными срезами, наиболее полно иллюстрирующими изучаемую стадию развития. Но в эмбриологических исследованиях обычно используют серийные срезы, когда на предметное стекло в четкой последовательности наклеивают все гистологические срезы, полученные с одного эмбриона. При гистологической резке объект ориентируют так, чтобы микротомный нож двигался в строго установленной плоскости. В зависимости от того, как прошел срез, различают срезы *фронтальные*, *поперечные* и *сагиттальные* (см. рис. 1, Б).

Методы работы с микроскопом

Человеческий глаз представляет собой естественную оптическую систему, характеризующуюся определенным *разрешением* — наименьшим расстоянием между элементами наблюдаемого объекта, при котором глаз еще может их различить. Для нормального глаза при удалении от объекта на так называемое расстояние наилучшего видения ($D = 250$ мм) минимальное разрешение составляет примерно 0,08 мм (а у многих людей — около 0,20 мм). Размеры большинства растительных и животных клеток, в том числе эмбриональных, значительно меньше этой величины. Для изучения таких объектов используют микроскопы (от «микро» и греч. *skopéo* — смотрю) различных типов. В течение последних 200 лет *световая микроскопия* является одним из основных методов в биологии. С помощью светового микроскопа можно определить форму, размеры, строение и многие другие характеристики микрообъектов. Световой микроскоп дает возможность различать структуры с расстоянием между элементами до 0,20 мкм. Более крупные эмбриологические объекты, имеющие размеры порядка не-

скольких миллиметров, например тотальные препараты, можно изучать с помощью более простой оптической системы — специальной *бинокулярной лупы*. Это оптическое устройство часто называют *стереомикроскопом*, так как оно предназначено для изучения объемных объектов и позволяет рассматривать их, сохраняя привычное для человека бинокулярное зрение (видение объекта обоими глазами). Схема прохождения оптических лучей в стереомикроскопе представлена на рис. 4, А. Общее увеличение стереомикроскопа равно произведению увеличения лупы на угловое увеличение окуляра и для модели МБС-10 составляет от 3,6 до 84 в зависимости от того, какой комплект окуляров используется.

Одна из типичных *оптических схем микроскопа* приведена на рис. 4, Б. Рассматриваемый объект (препарат — окрашенный гистологический срез объекта, лежащий на предметном стекле и по-

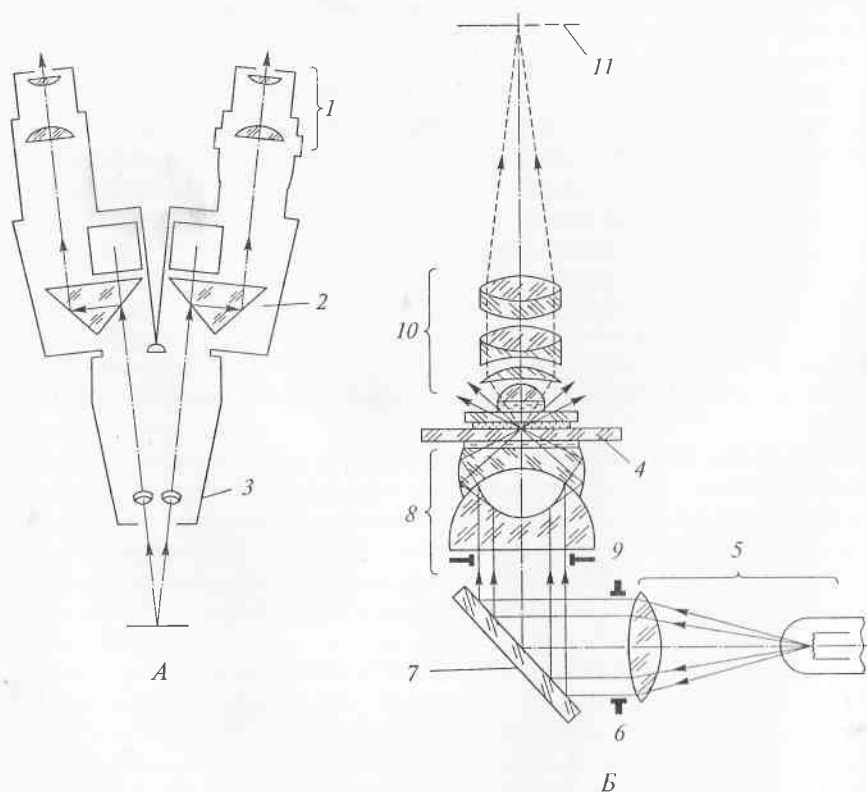


Рис. 4. Оптическая схема бинокулярной лупы (А) и микроскопа (Б):

1 — линзы окуляра; 2 — призмы; 3 — линзы объектива; 4 — предметное стекло с гистологическим препаратом; 5 — источник света; 6 — диафрагма осветителя; 7 — зеркало; 8 — конденсор; 9 — диафрагма конденсора; 10 — увеличивающие линзы микроскопа (объектив и окуляр); 11 — изображение объекта

крытый покровным) помещают на столик микроскопа. *Конденсор* концентрирует на объекте пучок света, отражающегося от зеркала. Источником света в микроскопе чаще всего служит специальный осветитель, состоящий из лампы и линзы-коллектора. Иногда с помощью зеркала микроскопа на объект направляют обычный дневной свет. Две диафрагмы — *полевая* (диафрагма осветителя) и *апертурная* (диафрагма конденсора) ограничивают световой пучок и уменьшают в нем долю рассеянного света, попадающего на препарат «со стороны» и не участвующего в формировании изображения. Линзы *объектива* и *окуляра* микроскопа увеличивают видимое изображение объекта.

Общее увеличение микроскопа равно произведению линейного увеличения объектива на угловое увеличение окуляра. Обычно объективы микроскопа имеют увеличения от 6,3 до 100, а окуляры — от 7 до 15 (их значения гравированы на оправках), поэтому общее увеличение микроскопа лежит в пределах от 44 до 1500.

Кроме увеличения большую роль играет *разрешающая способность микроскопа*. Ее критерием является предел, до которого две точки на препарате различимы как отдельные объекты. Это расстояние d_0 может быть рассчитано по формуле (приведена в упрощенном виде):

$$d_0 = 1,22\lambda / 2N.A.,$$

где λ — длина волны света; N.A. — числовая апертура, указанная на объективе: $N.A. = n \sin \sigma$ (σ — половина угла раскрытия объектива, n — коэффициент преломления иммерсионной среды между объективом и окуляром; для воздуха n равно 1, для иммерсионного масла и стекла — 1,51).

Таким образом, теоретически максимально возможное разрешение микроскопа ограничено законами оптической физики. Не следует пытаться повышать общее увеличение микроскопа за счет сильно увеличивающих окуляров при использовании объективов с малой числовой апертурой, так как он дает низкое разрешение и видимое микроскопическое изображение будет выглядеть несколько расфокусированным даже при полностью правильной настройке микроскопа.

Получение изображения препарата в микроскопе в основных (хотя и наиболее простых) чертах можно описать в рамках геометрической оптики (рис. 5). Лучи света, исходящие от объекта 7, преломляясь в объективе 8, создают перевернутое и увеличенное действительное оптическое изображение объекта — 7'. Это изображение рассматривают через окуляр 9. При визуальном наблюдении микроскоп фокусируют так, чтобы 7' находилось непосредственно за передним фокусом окуляра $F_{ок}$. В этих условиях окуляр работает как лупа: давая дополнительное увеличение, он образует мнимое изоб-

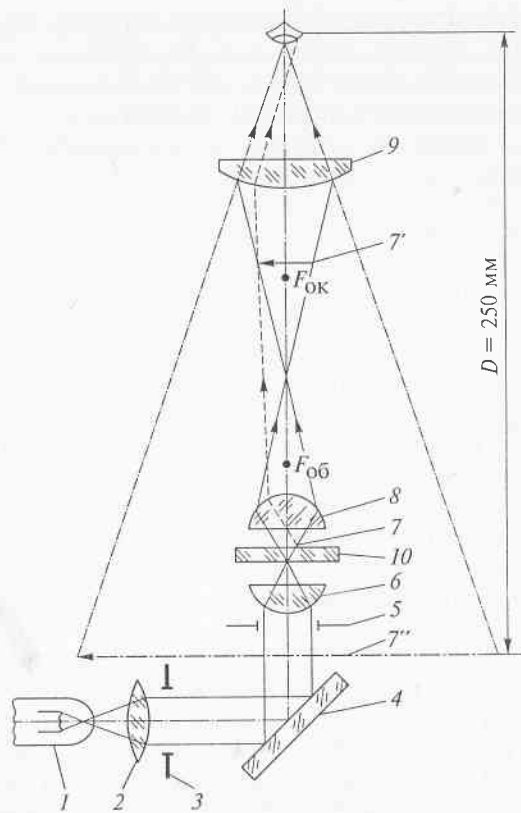


Рис. 5. Схема, поясняющая принцип действия микроскопа (увеличение размеров видимого микрообъекта за счет создания мнимого оптического изображения):

1 — источник света; 2 — линза осветителя; 3 — диафрагма осветителя; 4 — зеркало; 5 — диафрагма конденсора; 6 — оптическая система конденсора; 7 — объект (7' — увеличенное действительное изображение объекта; 7'' — мнимое оптическое изображение объекта); 8 — объектив; 9 — окуляр; 10 — гистологический препарат

ражение 7'' (по-прежнему перевернутое); проходя через оптические среды глаза наблюдателя, лучи от 7'' создают на сетчатке глаза действительное изображение объекта. Обычно 7'' располагается на расстоянии наилучшего видения от глаза — D . Если сдвинуть окуляр так, чтобы 7' оказалось перед $F_{ок}$, то изображение, даваемое окуляром, становится действительным и его можно получить на экране или фотопленке. По такой схеме осуществляют, в частности, фото- и киносъемку микроскопических объектов.

Для максимального использования оптических возможностей микроскопа необходимо правильно произвести настройку его оп-

тической системы. Основным способом, применимым для любого микроскопа, является *настройка света по Келлеру*:

1) положить препарат под микроскоп покровным стеклом вверх и при малом увеличении навести на резкость;

2) при помощи зеркала микроскопа направить свет на препарат (в тех случаях, когда осветитель соединен с микроскопом в единый блок, настройка света выполняется только при юстировке микроскопа мастером);

3) отодвинуть в сторону подвижную линзу конденсора (если такая есть в конструкции микроскопа) и фильтр конденсора;

4) закрыть ирисную диафрагму конденсора так, чтобы в поле зрения было только небольшое светлое пятно;

5) выставить светлое пятно в центр поля зрения микроскопа при помощи боковых винтов конденсора;

6) если рядом с ярким светлым пятном видны два менее ярких пятна «спутника», постараться их убрать, поменяв угол наклона зеркала;

7) опуская и поднимая конденсор с помощью его большого винта, добиться того, чтобы край ирисной диафрагмы был четко виден в поле зрения; при этом надо следить, чтобы препарат тоже был в фокусе;

8) открыть диафрагму конденсора, пока ее край не выйдет за пределы поля зрения (обычно — на $\frac{2}{3}$ диаметра диафрагмы), вернуть на место фильтр и линзу конденсора.

Если после настройки микроскопа поле зрения замутнено или покрыто пятнышками и пылинками, то это может быть вызвано: загрязнением верхней или (и) нижней линзы окуляра (для проверки надо повернуть окуляр в тубусе — загрязнение прокручивается вместе с окуляром); загрязнением линзы объектива; загрязнением препарата; загрязнением верхней линзы конденсора.

Проверять, где находится загрязнение, следует в приведенном выше порядке.

Оптику микроскопа протирают специальной салфеткой для оптики. Если ее нет, можно использовать чистую, но не крахмаленную хлопчатобумажную тряпочку (носовой платок) или мягкий бумажный носовой платок. Если после этого на линзе остались пылинки, их можно удалить струей воздуха из резиновой груши.

ЗАНЯТИЕ 1

СПЕРМАТОГЕНЕЗ

Первичные половые клетки

Клетки организма подразделяются на половые и соматические. У большинства организмов (насекомые, позвоночные и др.) образование половых клеток происходит на ранних этапах эмбриогенеза, в основе этого процесса лежит ооплазматическая сегрегация цитоплазмы. В отличие от соматических клеток половые клетки тотипотентны, т.е. они сохраняют способность формировать все органы и ткани организма.

Половые клетки у всех животных, имеющих морфологически выраженные гонады, закладываются вне гонады (экстрагонадно). С момента выделения и до вселения в гонаду их называют **первичными половыми клетками** (ППК). У большинства животных ППК — единственный источник зрелых гамет. ППК попадают в область зачатка гонады с током жидкости или, активно мигрируя, через клеточные пласты на большие расстояния посредством амебoidalного движения. Согласно существующим представлениям миграция клеток на дальние дистанции может происходить посредством *ганглотаксиса* (движение по градиенту адгезии к белкам внеклеточного матрикса), *контактного ориентирования* и *хемотаксиса*. У зародышей африканской шпорцевой лягушки *Xenopus laevis* обнаружена зависимость адгезии и миграции ППК от концентрации молекул фибронектина и от ориентации волокон этого гликопротеина во внеклеточном матриксе, которым выстлан путь ППК.

У некоторых видов ППК можно распознать по своеобразной морфологии (размеры, форма) либо по специфическим гистохимическим реакциям окрашивания цитоплазмы. Так, для ППК млекопитающих и птиц характерен высокий уровень активности щелочной фосфатазы. Используя метод выявления этого фермента, можно проследить путь перемещения ППК вплоть до момента проникновения в гонады. Первоначально ППК присутствуют в зародыше в небольшом количестве, но они проходят ряд делений и число их возрастает. У зародышей мыши первые ППК выявляются в стенке аллантаоиса в возрасте 7,5 суток, на 9-е сутки они видны у основания аллантаоиса и в прилегающем желточном мешке. Считается, что в этот момент ППК уже разделились на две группы, которые будут мигрировать в правую и левую гонады. Затем ППК двигаются вверх по дорсальной брыжейке; на 10—11-е сутки они

достигают закладки гонады и дают начало линии стволовых половых клеток в гонаде. ППК могут нормально дифференцироваться в половые клетки только в том случае, если попадут в половые ванночки и вступят в контакт с соматическими клетками гонад, получая при этом необходимую информацию для последующей дифференцировки в *оогонии* или *сперматогонии*. Если же на своем пути ППК оказываются в окружении других зачатков и не достигают гонад, то либо гибнут, либо становятся источником тератом.

Мужские и женские ППК неотличимы. Несмотря на то что пол зародыша определяется хромосомным набором, полученным зиготой при оплодотворении, различия в их строении становятся заметными лишь при дифференцировке половой железы. Зачатки мужских и женских гонад состоят из корковой и мозговой области. В случаях развития семенников или яичников возникают различия в положении половых клеток: у самцов они располагаются в мозговой, а у самок — в корковой области, давая начало соответственно сперматогониям либо оогониям.

Дальнейшее развитие половых клеток — *гаметогенез* — происходит в семенниках или яичниках. Процесс развития мужских половых клеток называется *сперматогенезом* (*sperma* — семя, *genesis* — происхождение), женских половых клеток — *оогенезом* (*ovum* — яйцо).

Особенности сперматогенеза

Сперматогенез — это процесс превращения исходно диплоидных стволовых клеток в гаплоидные сперматозоиды (рис. 6). В нем выделяют 4 периода:

- 1) период размножения;
- 2) период роста;
- 3) период созревания;
- 4) период формирования сперматозоида (спермиогенез).

Сперматогенез происходит в мужских гонадах — семенниках (*testis*). У некоторых животных, например у губок и плоских червей, истинные гонады отсутствуют и сперматогенез осуществляется в рассеянных по телу сперматогенных скоплениях.

В течение **периода размножения** диплоидные мужские половые клетки — *сперматогонии* — делятся путем митоза несколько раз, причем число делений у каждого вида постоянно и варьирует от 3 до 5. Крайние варианты отмечены у клещей (всего 2 деления) и рыб (до 14 делений). Последующие генерации сперматогоний отличаются от первых по величине и степени конденсации хроматина. Поколения делящихся клеток обозначают по-разному: вторичные типа А₁, А₂, А₃, А₄, А₅, промежуточный тип, тип Б. Чис-

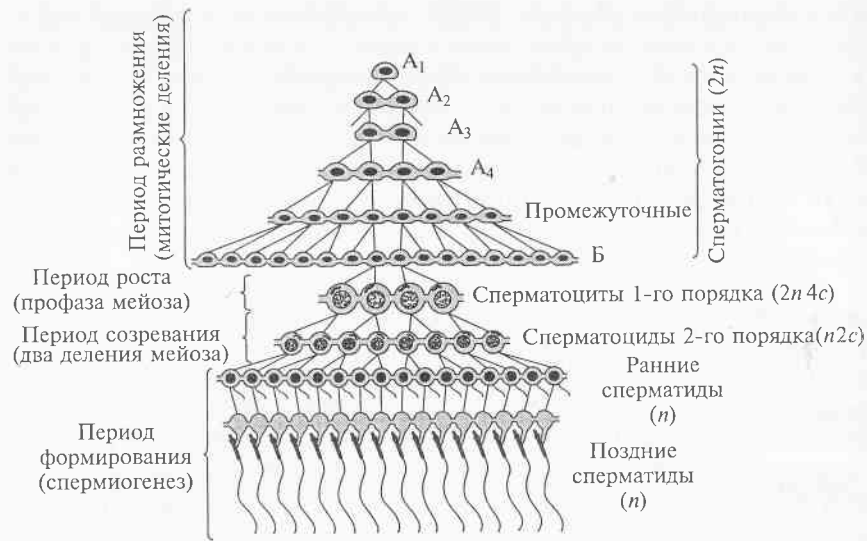


Рис. 6. Схема сперматогенеза (по M. Dym; D. W. Fawcett, 1971)

ло сперматозоидов у каждого животного зависит не от количества делений сперматогоний, а от одновременно размножающихся сперматогенных клеток. В отличие от *оогоний* у делящихся сперматогоний цитотомия завершается не полностью и между соседними клетками остаются межклеточные цитоплазматические мостики (*фузоны*), объединяющие дочерние клетки в *синцитиальный клон*. Фузоны в семенном эпителии обнаружены почти у всех животных от кишечнополостных до млекопитающих и сохраняются вплоть до терминальных стадий спермиогенеза. Это способствует синхронности развития половых клеток и равномерному распределению продуктов экспрессии генов между всеми клетками клона.

Как всякая обновляющаяся ткань, популяция мужских половых клеток содержит *стволовые клетки* (A -стволовые или A_0). Стволовые клетки расположены изолированно, их митотическая активность низка, но при делении могут появиться дочерние клетки, соединенные цитоплазматическими мостиками, образующие синхронно развивающийся клон. Их появление рассматривается как первый шаг к дифференцировке сперматогоний. По завершении размножения в последней генерации сперматогоний в предмейотической интерфазе происходит репликация ДНК и удвоение хромосом.

Второй период сперматогенеза — *период роста*. Половые клетки на этой стадии называются *сперматоцитами первого порядка* (*сперматоциты I*). Они несколько увеличиваются в объеме, а в их ядрах происходит профаза мейоза, во время которой осуществля-

ются подготовка к редукции числа хромосом, конъюгация и кроссинговер. Последовательные события профазы мейоза происходят в ходе стадий *лептотены*, *зиготены*, *пахитены* и *диплотены*. Во время *лептотены* хромосомы становятся заметными и имеют вид длинных нитей. В клетках с небольшим количеством хромосом удается подсчитать их число. *Зиготена* начинается со сближения и спаривания (конъюгации) парных гомологичных хромосом. Сближение идет постепенно — сначала в одной точке, потом по всей хромосоме. На стадии *пахитены* конъюгация гомологичных хромосом заканчивается и получается уменьшенное вдвое (гаплоидное) число нитей, отличающихся от лептономных хромосом своей толщиной: каждая толстая нить соответствует паре гомологичных хромосом, т.е. является бивалентной. На стадии *диплотены* гомологи расходятся, между ними возникают щели, но в отдельных участках (*хиазмы*) они все еще остаются спаренными, и здесь еще возможен кроссинговер. В каждом гомологе различаются сестринские хроматиды, т.е. выявляется четырехмерная структура бивалента — тетрада.

Для осуществления конъюгации, кроссинговера и обратимости гомологичного спаривания хромосом между ними образуется специальный *синаптонемальный комплекс* (СК) (*синаптогема* — нить спаривания). Он представляет собой структуру, состоящую из трех лентовидных образований — двух латеральных, вытянутых вдоль каждого гомолога, и одного центрального, соединяющего боковые множеством поперечных нитей (рис. 7). СК начинает формироваться на стадии *лептотены*, когда появляются его осевые тяжи. В *зиготене* между ними образуются поперечные нити, формирующие центральный элемент комплекса. В *пахитене*, когда конъюгация гомологичных хромосом становится полной, формирование СК завершается. При расхождении гомологов на стадии *диплотены* он «сползает» с хромосом и лишь отдельные его фрагменты сохраняются в области хиазм. В результате отталкиваний бивалентов и деспирализации ДНК в этих областях формируются хромосомы типа «ламповых щеток». На деконденсированных участках отмечен интенсивный синтез РНК.

В течение третьего периода, *периода созревания*, совершаются два деления созревания и осуществляется редукция числа хромосом. При первом делении (редукционном) к полюсам расходятся гомологичные хромосомы, при втором делении (эквационном) — сестринские хроматиды. Второе деление созревания быстро следует за первым, иногда без собственной интерфазы. После первого деления созревания клетки сперматогенного ряда называют *сперматоцитами второго порядка* (*сперматоцитами II*), а после второго деления созревания — *сперматидами*. Таким образом, из каждого сперматоцита I получается два сперматоцита II, а затем четыре одинаковые по размерам гаплоидные клетки — сперматиды.

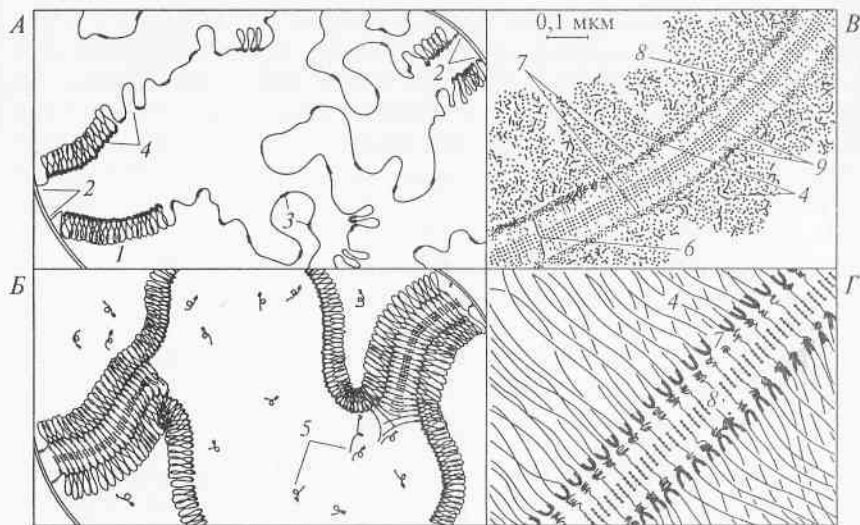


Рис. 7. Схематическое изображение последовательности событий при синапсе гомологов в мейозе тутового шелкопряда (по R. S. King, 1970, R. S. King, H. Akai, 1971):

А — стадии лептотены профазы мейоза; Б — стадия зиготены; В, Г — стадия пахитены профазы мейоза; 1 — ядерная оболочка; 2 — теломеры; 3 — синаптомеры; 4 — хроматиновые нити; 5 — зигосомы; 6 — синаптонемальный комплекс; 7 — латеральные элементы; 8 — поперечные нити центрального комплекса; 9 — центральное пространство

Итак, во время второго и третьего периодов сперматогенеза происходит в результате мейоза рекомбинация генов в гомологичных хромосомах и образуются гаплоидные клетки.

Сперматиды более не делятся и вступают в завершающий четвертый период развития — **спермиогенез**, превращаясь после ряда преобразований в сперматозоиды (рис. 8). Сперматида — относительно небольшая гаплоидная недифференцированная клетка, находящаяся в составе синцитиального клона, претерпевает сложное развитие, приобретает видоспецифичные признаки. В процессе формирования значительно уменьшается объем ядра, это сопровождается конденсацией хроматина и элиминацией карิโอплазмы. В результате экспрессия генов в ядре сперматиды полностью прекращается и хроматин превращается в метаболически инертную массу. Ядро смещается в ту часть клетки, которая становится головкой спермия. Формируется специфическая для сперматозоида органелла — акросома, представляющая собой видоизмененную лизосому. Она образуется из аппарата Гольджи и располагается в переднем отделе головки сперматозоида. Чаще всего акросома имеет форму колпачка или пузырька, содержит спермолизины, необходимые сперматозоиду для проникновения через по-

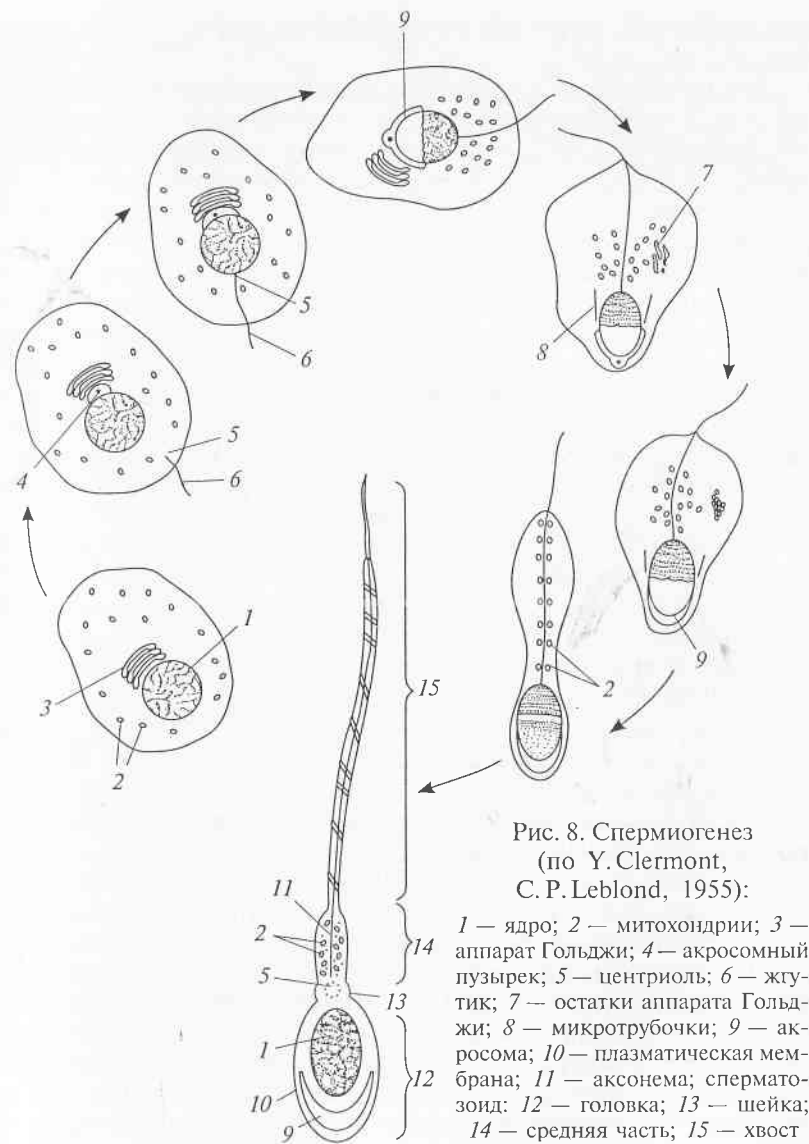


Рис. 8. Спермиогенез (по Y. Clermont, C. P. Leblond, 1955):

1 — ядро; 2 — митохондрии; 3 — аппарат Гольджи; 4 — акросомный пузырек; 5 — центриоль; 6 — жгутик; 7 — остатки аппарата Гольджи; 8 — микротрубочки; 9 — акросома; 10 — плазматическая мембрана; 11 — аксонема; сперматозоид: 12 — головка; 13 — шейка; 14 — средняя часть; 15 — хвост

кровы яйца. У некоторых видов, например у морского ежа, между акросомным пузырьком и ядром имеется область, содержащая глобулярный актин, который при оплодотворении полимеризуется, образуя акросомный вырост. У некоторых видов животных акросома отсутствует. Например, у костистых рыб и некоторых насекомых безакросомный сперматозоид при оплодотворении проникает в ооцит через специальное отверстие в оболочке яйца —

микропиле (см. далее рис. 82, А, в разделе «Рыбы. Работа с живым материалом...»).

Другие клеточные органеллы дифференцирующейся сперматиды тоже претерпевают существенные изменения. Центриоли перемещаются под ядро, в область формирующейся шейки сперматозоида. Дистальная центриоль становится базальным тельцем, от которого берет начало аксонема жгута, состоящая из двух центральных микротрубочек, окруженных кольцом из девяти двойных периферических фибрилл. Осевой фибриллярный комплекс жгутика сперматозоида обозначают формулой $9(2) + 2$. Митохондрии также перемещаются под ядро и окружают кольцом или спиралью основание жгутика. У некоторых видов изменяется и ультраструктура митохондрий сперматиды: они сливаются, образуя единую органеллу — хондросому. Митохондрии вырабатывают энергию, обеспечивающую подвижность жгутика сперматозоида.

Сперматиды утрачивают во время сперматогенеза большую часть цитоплазмы вместе с органеллами, такими, как рибосомы, эндоплазматический ретикулум, аппарат Гольджи, чье присутствие не требуется для передачи ДНК яйцеклетке. От цитоплазмы остается лишь тонкий слой, покрывающий сперматозоид (кроме концевой части хвоста). Иногда при сползании цитоплазмы остаются резидуальные капли, которые исчезают позднее. К концу периода формирования происходит индивидуализация половых клеток, клон разрушается и свободные сперматозоиды выходят в просвет канала семенника. Сперматозоид в высокой степени специализирован для выполнения основных функций: активации яйцеклетки (запускание программы развития) и введение своей ДНК в женскую половую клетку.

За редким исключением сперматозоиды животных относятся к жгутиковым клеткам. Сперматозоид состоит из головки, содержащей необычно уплотненное гаплоидное ядро и акросому, хвоста, способствующего перемещению к месту оплодотворения, и связующей шейки (см. рис. 8). В деталях строения жгутиковые сперматозоиды могут существенно различаться (размеры, форма и наличие акросомы и т. д.). Существуют и безжгутиковые сперматозоиды (круглые черви, высшие раки, моллюски), имеющие, как правило, причудливые формы (рис. 9).

В эякуляте сперматозоиды суспензированы в семенной жидкости, которая является смесью секретов желез мужского репродуктивного тракта. Относительная концентрация сперматозоидов в эякуляте весьма важна для оплодотворения и колеблется от 50 до 170 млн в 1 мл. Между размерами животного и размерами сперматозоида нельзя выявить явного соотношения. Сперматозоид воробья, например, составляет в длину 200 мкм, тритона — 500 мкм, аксолотля — 400 мкм, человека — 50—70 мкм, морского ежа — 40 мкм. На фертильность сперматозоидов (их способность опло-

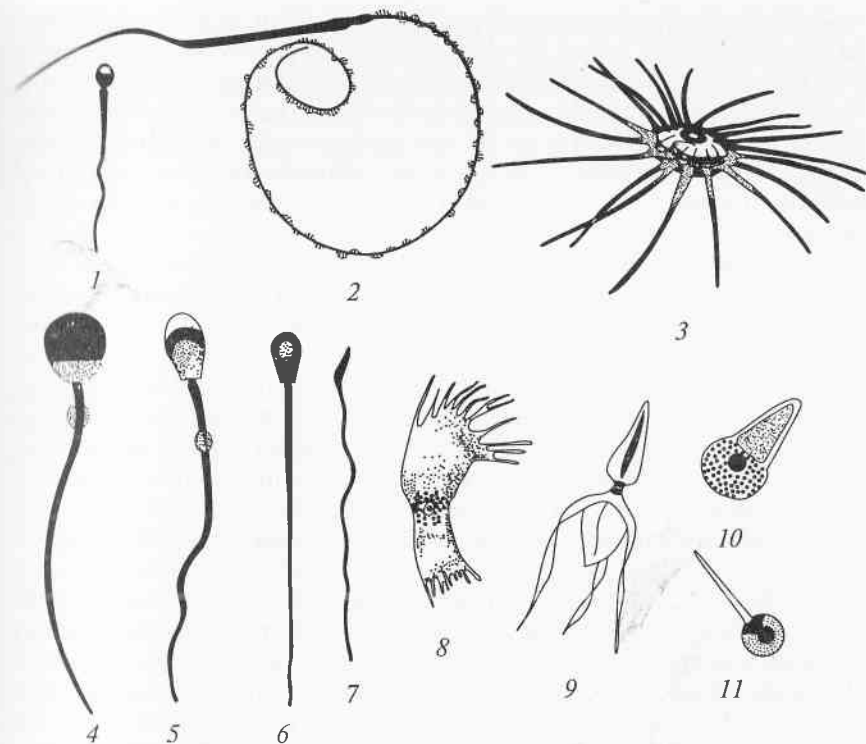


Рис. 9. Формы сперматозоидов человека и животных:

1 — человек; 2 — тритон; 3 — речной рак; 4 — морская свинка; 5 — свинья; 6 — утка; 7 — петух; 8 — ветвистый рак; 9 — десятиногий рак; 10 — лошадиная аскарида; 11 — острица

дотворять яйцеклетку) влияют резкие температурные перепады, изменения физико-химических свойств среды обитания, замораживание и оттаивание. Срок фертильности у различных млекопитающих варьирует в пределах от 14 ч у крыс до 24 ч у человека. Птицы при однократном осеменении продолжают нести оплодотворенные яйца в течение 3 недель. У некоторых видов животных сперматозоиды могут длительно пребывать в состоянии анабиоза и оплодотворять яйцеклетку через долгий срок. Так, у летучих мышей анабиоз длится весь зимний период.

У позвоночных выделяют четыре типа строения семенников.

1. **Фолликулярный тип.** Этот тип характерен для круглоротых. Структурно-функциональной единицей органа является фолликул, выстланный фолликулярными клетками. Между отростками этих клеток располагаются половые клетки. После образования сперматид в период формирования половые клетки теряют связь с фолликулярными клетками и свободно заполняют просвет.

2. **Фолликулярно-цистный тип.** К этому типу относят семенники хрящевых рыб и хвостатых амфибий. В фолликулах хрящевых рыб половые клетки находятся в составе карманообразных цист. Каждая циста образована одной фолликулярной клеткой, а у хвостатых амфибий стенка цисты состоит из нескольких фолликулярных клеток. Половые клетки в составе всех цист одного фолликула развиваются синхронно. В соседних фолликулах стадии сперматогенеза могут быть иными.

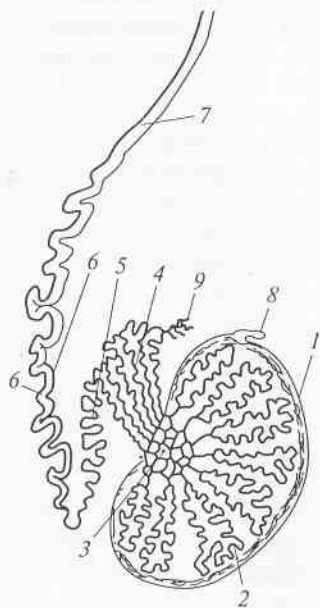
3. **Канальцево-цистный тип.** Семенники костистых рыб и бесхвостных амфибий морфологически сходны и состоят из канальцев, в которых формируются цисты. Стенку цист образуют несколько фолликулярных клеток. Половые клетки развиваются в канальцах внутри цист. К началу спермиогенеза стенка цисты нарушается, но контакт сперматид и фолликулярных клеток сохраняется. Сперматиды, погруженные в цитоплазму фолликулярной клетки, завершают процесс формирования, после чего происходит *спермиация* — выход сперматозоидов в просвет канальца.

4. **Канальцевый тип.** Сперматогенез у рептилий, птиц и млекопитающих осуществляется в семенных извитых канальцах (рис. 10), в которых нет цист. Между фолликулярными клетками, выстилающими внутреннюю стенку канальца — *клетками Сертоли*, и половыми клетками на протяжении всего сперматогенеза сохраняется сложная взаимосвязь. Половые клетки располагаются в сети цитоплазматических отростков фолликулярных клеток, причем одна фолликулярная клетка связана одновременно с ге-

терогенной популяцией половых клеток. В базальной зоне канальца на базальной мембране расположены гонии, в центральной — сперматоциты, в апикальной, глубоко имплантируясь в цитоплазму клеток Сертоли, — сперматиды. По мере созревания половые клетки смещаются к просвету канальца и осуществляется их спермиация.

Рис. 10. Строение семенника человека:

1 — белочная оболочка (плотная соединительнотканная капсула семенника); 2 — извитые семенные канальцы; 3 — сеть семенника; 4 — выносящие канальцы семенника; 5 — выносящий каналец головки придатка семенника; 6 — спирально свернутый проток придатка семенника; 7 — семявыносящий проток; 8 — привесок семенника (везикулярный рудимент протоков мезонефроса); 9 — привесок придатка семенника (рудимент мезонефроса)



Продолжительность сперматогенеза у человека составляет 64 дня, у мыши — 35 дней, у крысы — 48 дней. У большинства позвоночных животных семенники функционируют сезонно, что связано с особенностями размножения. В период покоя в семенниках наступают деструктивные изменения. Неиспользованные половые продукты подвергаются активному фагоцитозу фолликулярными клетками.

Препараты к занятию «Сперматогенез»

Препараты к этому занятию иллюстрируют различия в строении жгутиковых сперматозоидов разных видов позвоночных и цитологические изменения, происходящие в процессе сперматогенеза в семеннике крысы.

Препарат № 1. Мазок спермы морской свинки

Задание. Под микроскопом при малом увеличении (объектив $\times 8$) найдите на препарате отдельно лежащий сперматозоид с неповрежденной хвостовой нитью. Переведя микроскоп на большое увеличение (объектив $\times 40$), зарисуйте строение сперматозоида.

Сперму для мазков берут из придатков семенников, наносят ее тонким слоем на предметное стекло, фиксируют и окрашивают. На световом уровне не удастся рассмотреть тонких деталей строения (митохондрии, центриоли, аксонему) — эти структуры наблюдают при электронно-микроскопическом исследовании. На мазках можно рассмотреть лишь общую форму, основные отделы и относительные размеры клетки (рис. 11, А). Сперматозоиды морской свинки — типичные жгутиковые гаметы. Общая длина сперматозоида равна 100 мкм. Отчетливо выражена головка, шейка и хвостик. Большую часть округлой, уплощенной головки занимает ядро, состоящее из плотного конденсированного хроматина. Огромная акросома расположена на апикальном конце головки, занимает примерно $\frac{1}{3}$ ее части и имеет форму колпачка. Область шейки и промежуточный отдел (место, где располагается митохондриальная спираль) сливаются и несколько утолщены по сравнению с продолжением хвоста. В этой области сохраняется резидуальная цитоплазма в виде капельки, мешочка, а чаще всего — муфточки.

Резидуальная цитоплазма обычно исчезает по мере прохождения сперматозоида по канальцам придатка семенника. Главный отдел хвоста длинный, покрыт цитоплазматической оболочкой, отсутствующей лишь в дистальном отделе.

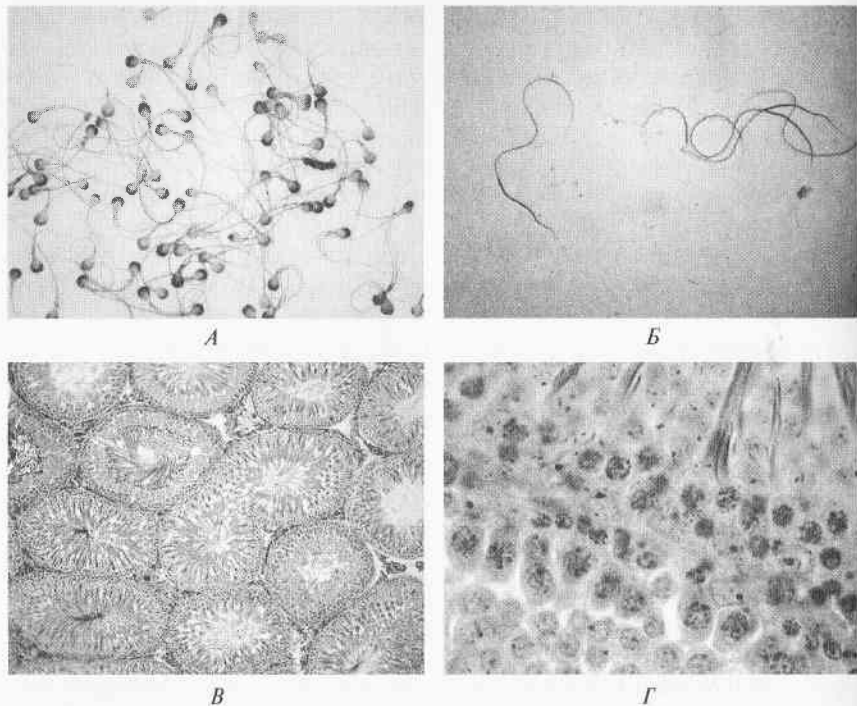


Рис. 11. Препараты к занятию «Сперматогенез»:

А — мазок спермы морской свинки (объектив $\times 40$); Б — мазок спермы тритона (объектив $\times 40$); В — гистологический срез семенника крысы: общий вид (объектив $\times 10$); Г — гистологический срез семенника крысы: стенка семенного канальца (объектив $\times 40$)

Иногда на препаратах можно увидеть «многохвостные» спермии или пучки спермиев — результат склеивания нескольких сперматозоидов, обладающих высокой способностью к агглютинации.

Препарат № 2. Мазок спермы тритона

Задание. Под микроскопом при малом увеличении (объектив $\times 8$) найдите на препарате область, где лежат несколько сперматозоидов. Выберите отдельно лежащий сперматозоид с неповрежденной головкой и хвостовой нитью. Переведите микроскоп на большое увеличение (объектив $\times 40$) и зарисуйте строение сперматозоида (рис. 11, Б).

Сперматозоиды тритона при малом увеличении похожи на тонкие нити, и иногда их бывает трудно найти на препарате. Ундулирующая мембрана сперматозоида тритона настолько тонка, что не воспринимает гистологическую окраску. Она прозрачна и может быть не видна при классической настройке света по Келлеру. Чтобы ее визуализировать, прикройте диафрагму конденсора. Если это не поможет, можно, вращая винт, немного опустить весь конденсор.

В деталях строения жгутиковые сперматозоиды могут очень отличаться друг от друга по ряду признаков. Сперматозоиды тритона, как и морской свинки, относятся к жгутиковым формам, размер клетки примерно 500 мкм. Головка сильно вытянута и заострена, имеет форму гарпуна или вязального крючка. Под акросомой (10 мкм) располагается плотное стержневидное ядро (70 мкм). К задней его части примыкает очень короткая шейка (8 мкм). Цитоплазматическая оболочка длинного хвоста формирует ундулирующую мембрану, отсутствующую лишь в самом дистальном отделе.

Препарат № 3. Семенник крысы (гистологический срез)

Задание. Под микроскопом при малом увеличении (объектив $\times 8$) рассмотрите и схематично зарисуйте срез семенника (рис. 11, В). Найдите на препарате поперечный срез семенного канальца (округлый или слабо овальный, с видимым просветом по середине) и переведите микроскоп на большее увеличение (объектив $\times 40$). Зарисуйте сектор стенки канальца, обращая внимание на размеры и взаиморасположение ядер различных клеток сперматогенного ряда, а также на форму, строение и расположение ядер клеток Сертоли (рис. 11, Г).

Данный препарат представляет собой срез семенника крысы толщиной 5—7 мкм. Как правило, такой препарат бывает окрашен по одной из двух методик: железным гематоксилином (черно-серая окраска, дающая высокий контраст; хорошо видна структура ядер клеток сперматогенного ряда) или квасцовым гематоксилином по Каррачи и эозином (темно-синие ядра и розоватая цитоплазма).

На срезе канальцы выглядят округлыми либо овальными в зависимости от плоскости сечения. Между ними располагаются соединительная ткань и клетки Лейдига, основная функция которых — синтез мужского полового гормона тестостерона, необходимого для осуществления сперматогенеза. Стенку канальцев образуют несколько клеточных слоев дифференцирующихся половых клеток, развитие которых происходит в направлении от базальной мембраны к просвету канальца (рис. 12). Помимо сперма-

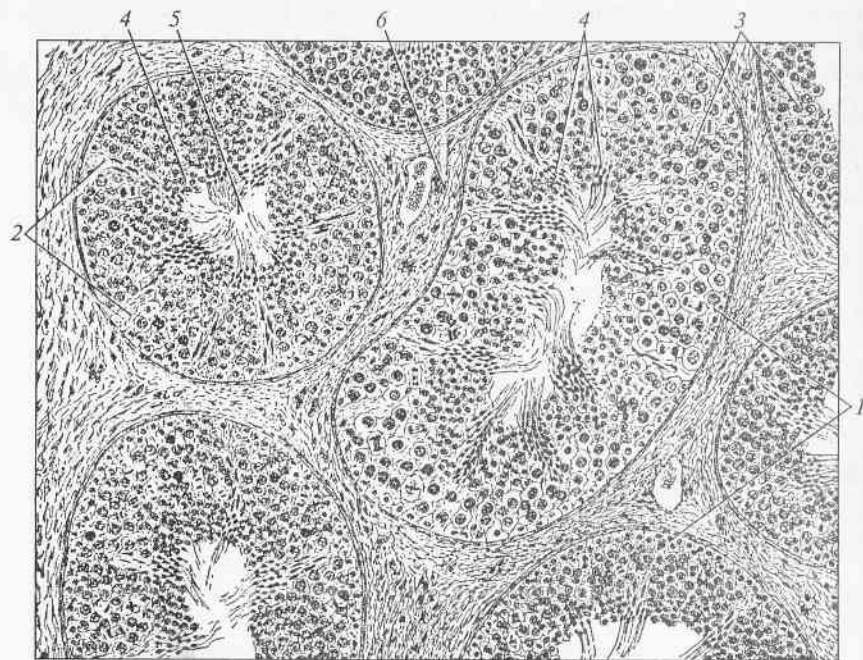


Рис. 12. Срез извитых канальцев семенника крысы:

1 — сперматогонии; 2 — ядра клеток Сертоли; 3 — сперматозоиды; 4 — сперматозоиды в стенке семенного канальца; 5 — хвосты поздних сперматид в просвете семенного канальца; 6 — соединительная ткань

тогенного эпителия (сперматогониев и их потомков) в состав стенки канальцев входят и соматические по происхождению клетки Сертоли (суспендоциты). Основания этих клеток находятся на базальной мембране канальца, а ветвящиеся отростки обращены в сторону его просвета и образуют специфические контакты с клетками сперматогенного эпителия (рис. 13). Рассмотреть границы клеток Сертоли невозможно, но хорошо различимы ядра. Обширная цитоплазма заполняет все промежутки между половыми клетками. Светлые ядра клеток Сертоли, обычно треугольной либо овальной формы, содержат одно ядрышко, располагаются в базальной части клетки. Функции их многообразны: трофическая, опорная, регуляторная, фагоцитоз. У взрослых особей эти клетки не делятся. Сперматогенез начинается в периферических участках извитых канальцев. Между основаниями клеток Сертоли у базальной мембраны находятся клетки с относительно крупным ядром и небольшим количеством цитоплазмы — сперматогонии. Если гистологический препарат окрашен железным гематоксилином, то можно заметить различия в строении ядер сперматогоний разных генераций. Для сперматогониев типа А характерны два вари-

анта ядер: с деконденсированным, равномерно распределенным хроматином (светлые ядра) и с конденсированным хроматином (темные ядра). Вблизи ядерной мембраны расположены ядрышки. В сперматогониях типа Б хроматин конденсирован и распределен у ядерной мембраны.

Ярус семенного канальца (базальный компартмент), в котором расположены сперматогонии, обозначается зоной размножения и отделяется от околополостного отсека канальца специализированными соединениями между отростками клеток Сертоли, однако на световом уровне этих деталей в строении клеток Сертоли обычно не видно. В околополостном отсеке ярусами располагаются последовательно сперматозоиды первого порядка (зона рос-

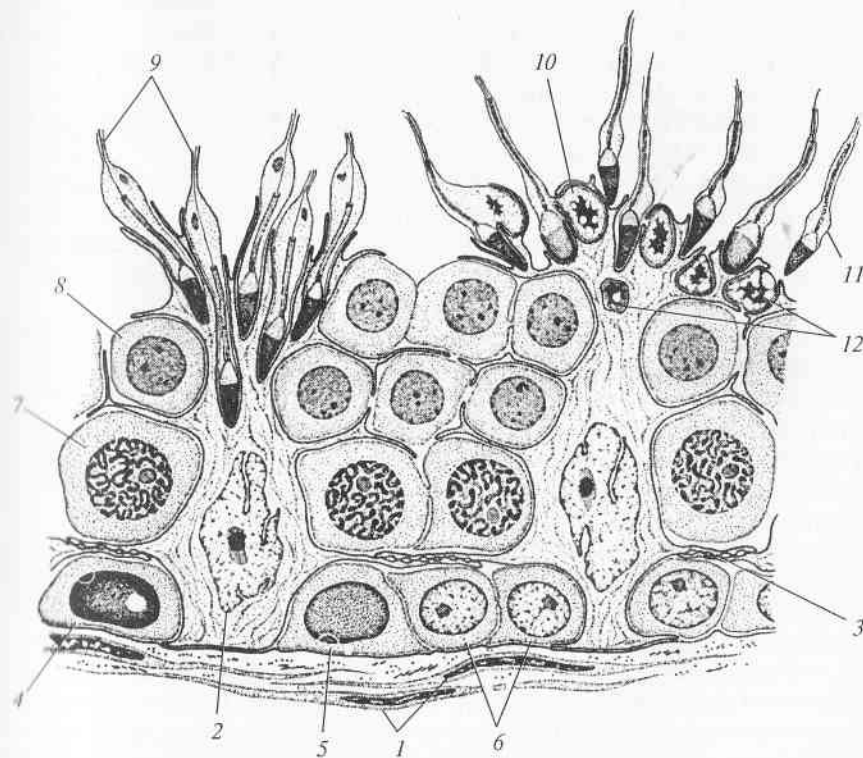


Рис. 13. Схема строения сперматогенного эпителия:

1 — ядра клеток оболочки семенного канальца; 2 — ядро клетки Сертоли; 3 — зоны плотных контактов между отростками соседних клеток Сертоли; 4, 5 — сперматогонии типа А; 6 — сперматогонии типа Б; 7 — сперматозоиды первого порядка; 8 — ранние (округлые) сперматиды; 9 — поздние (удлиненные) сперматиды; 10 — отделение резидуального тельца; 11 — сперматозоид в просвете семенного канальца; 12 — резидуальные тельца

та) и ближе к просвету — сперматиды (зона формирования сперматозоидов).

Различить половые клетки на определенном этапе сперматогенеза возможно не только по их ярусному расположению в стенке канальца, но и по характерным морфологическим особенностям. Сперматоциты I — это наиболее крупные по размерам клетки; их ядра почти в два раза больше ядер сперматогоний и имеют характерную «грубую» сетчатую структуру ядер, которая особенно характерна для пахитены и диплотены профазы мейоза.

По завершении ядерных перестроек в периоде роста сперматоциты I приступают к делениям созревания. В результате первого (редукционного) деления образуются сперматоциты второго порядка. Они меньше по объему и располагаются ближе к просвету канальца. Из-за краткости соответствующей интерфазы они крайне редко обнаруживаются на срезах, также имеют ядро с сетчатой структурой, но рисунок сетки менее «грубый», чем в ядрах сперматоцитов первого порядка.

Самый верхний ярус стенки канальца занимают гаплоидные сперматиды, образующиеся после второго (эквационного) деления мейоза. Популяции сперматид, видимые на разных срезах семенных канальцев, существенно различаются, так как находятся на разных этапах трансформации сперматид в сперматозоиды. Как правило, на одном срезе стенки семенного канальца можно увидеть сперматиды сразу двух возрастов — ранние и поздние.

Ранние сперматиды — небольшие овальные клетки с хорошо заметными контурами светлых ядер, хроматин в которых дисперсно распределен и имеет тонкозернистую структуру. Очень часто на периферии ядра видна довольно крупная темная гранула — формирующаяся акросома сперматозоида.

В процессе спермиогенеза сперматида приобретает морфологические свойства, характерные для спермия: ядро уплотняется и образует основную часть головки, формируется акросома, из дистальной центриоли начинает расти жгутик, цитоплазма в основном редуцируется.

Поздние сперматиды имеют темную окраску ядер, их жгутики направлены в просвет канальца. Часто сперматиды старших возрастов глубоко имплантируются в глубокие крипты, которые формируются в апикальной части клеток Сертоли и располагаются в ней пучками (каждый пучок — это один синцитиальный клон).

Гистологический срез может пройти как вдоль, так и поперек такого пучка сперматид. В зависимости от этого поздние сперматиды могут быть видны на препарате полностью или будет замечен пучок сперматид в виде группы темных точек: крупных, если срез прошел через головки, и мелких, если срез прошел через хвосты сперматид (рис. 11, Г).

Цитологическая картина на поперечных срезах в разных участках семенных канальцев оказывается неодинаковой, что связано с различием соотношения сперматогенных клеток разных этапов развития. В некоторых случаях на срезе могут присутствовать сперматиды только одного возраста, полностью сформированные сперматозоиды в просвете канальцев также видны не на всех срезах. На завершающем этапе клетки индивидуализируются, нарушается связь с клетками Сертоли и сперматозоиды выходят в просвет канальца.

ООГЕНЕЗ

Оогенезом называется дифференцировка половых клеток по женскому типу. Женская половая клетка — *яйцеклетка* — высокоспециализированная гаплоидная клетка организма, обладающая потенциальной способностью к развитию. В ее цитоплазме запасено все, что необходимо для роста и развития зародыша. Если сперматозоид в ходе спермиогенеза избавляется от большей части своей цитоплазмы, то ооцит активно накапливает различные трофические компоненты и органеллы, РНК, структурные белки, предшественники синтеза ДНК и РНК, а также *желток*, который служит источником питания для зародыша. Количество и распределение желтка имеют важное значение для развития. Яйцеклетки животных, у которых личинки или зародыши рано переходят на активное питание, содержат мало желтка. В тех случаях, когда яйцеклетка содержит большие запасы желтка, из яйцевых оболочек выходит вполне сформированная особь. В яйцеклетках плацентарных млекопитающих, чьи эмбрионы развиваются внутриутробно и получают питательные вещества из материнского организма, объем желтка составляет менее 5% объема яйца. Другими словами, количество желтка определяет условия и продолжительность развития зародыша.

По количеству желтка яйцеклетки подразделяются на многожелтковые (*полилецитальные*), маложелтковые (*олиголецитальные*) и содержащие среднее количество желтка (*мезолецитальные*). Иногда выделяют и практически безжелтковые яйцеклетки (*алецитальные*). Количество желтка в яйце видоспецифично, строго детерминировано и не зависит от условий питания самки.

Желток может размещаться в клетке равномерно (*изо-* или *гомолецитальные яйцеклетки*) либо смещен к одному из полюсов (*телолецитальные яйцеклетки*), у некоторых животных желток накапливается в центре яйца, а цитоплазма его окружает (*центролецитальные яйцеклетки*). В случае телолецитальных яйцеклеток полюс, на котором расположен желток, называется *вегетативным*, а противоположный ему — *анимальным*. Характеризуя яйцеклетку, важно указать, какое количество желтка в ней содержится и каким образом он распределен. Например, к полилецитальным телолецитальным относятся яйцеклетки костистых рыб, рептилий, птиц; к телолецитальным центролецитальным — яйцеклетки на-

секомых. Олиголецитальные изолецитальные яйцеклетки характерны для большинства червей, моллюсков, иглокожих. У амфибий и осетровых рыб яйцеклетки мезолецитальные и телолецитальные, а у плацентарных млекопитающих они практически не содержат желтка и характеризуются как алецитальные.

Кроме *плазматической оболочки*, характерной для каждой живой клетки, яйцеклетки обычно окружены специализированными оболочками. Различают *первичные оболочки*, которые формируются самим яйцом, *вторичные оболочки* — образуются фолликулярными клетками, окружающими половую клетку, и *третичные оболочки* — выделяются клетками яйцевода при прохождении по нему овулировавшего яйца. Первичная оболочка — желточная — прилегает к поверхности яйцеклетки и присуща всем животным; иногда она бывает пронизана выростами яйца, выглядит радиально исчерченной и называется *zona radiata*. Вторичные и третичные оболочки есть не у всех яиц. Жесткий непроницаемый *хорион*, покрывающий яйца насекомых, секретруется фолликулярными клетками. Яйца амфибий окружены прозрачной и толстой студенистой *третичной оболочкой*. У птиц различают несколько третичных оболочек: *белковую, две подскорлуповую и скорлуповую*.

Форма яиц — шаровидная, овальная, реже удлиненная (некоторые насекомые). Размеры варьируют в широких пределах — от нескольких микрометров (поперечник яйца паразитических перепончатокрылых равен 7 мкм) до нескольких сантиметров (у сельдевой акулы — 22 см), что зависит от типа развития животного. Но даже у плацентарных млекопитающих, зародыши которых все необходимое для своего развития получают от материнского организма, яйцеклетки значительно крупнее соматических клеток. Диаметр яйца у ланцетника около 100 мкм, у лягушки — 2 мм, у курицы — 3,5 см, у мышевидных грызунов — 75—90 мкм, у кроликов, кошек, собак — 120—130 мкм, у человека — 130 мкм.

Особенности оогенеза

Процесс развития женских половых клеток — оогенез — имеет ряд общих черт с процессом сперматогенеза и целый ряд отличий. Женская половая клетка, завершившая развитие (яйцеклетка), обладает гаплоидным ядром, сложно организованной цитоплазмой и всеми факторами, необходимыми для инициации и поддержания развития. Оогенез совершается в три этапа, называемых периодами (рис. 14):

- 1) период размножения;
- 2) период роста;
- 3) период созревания.

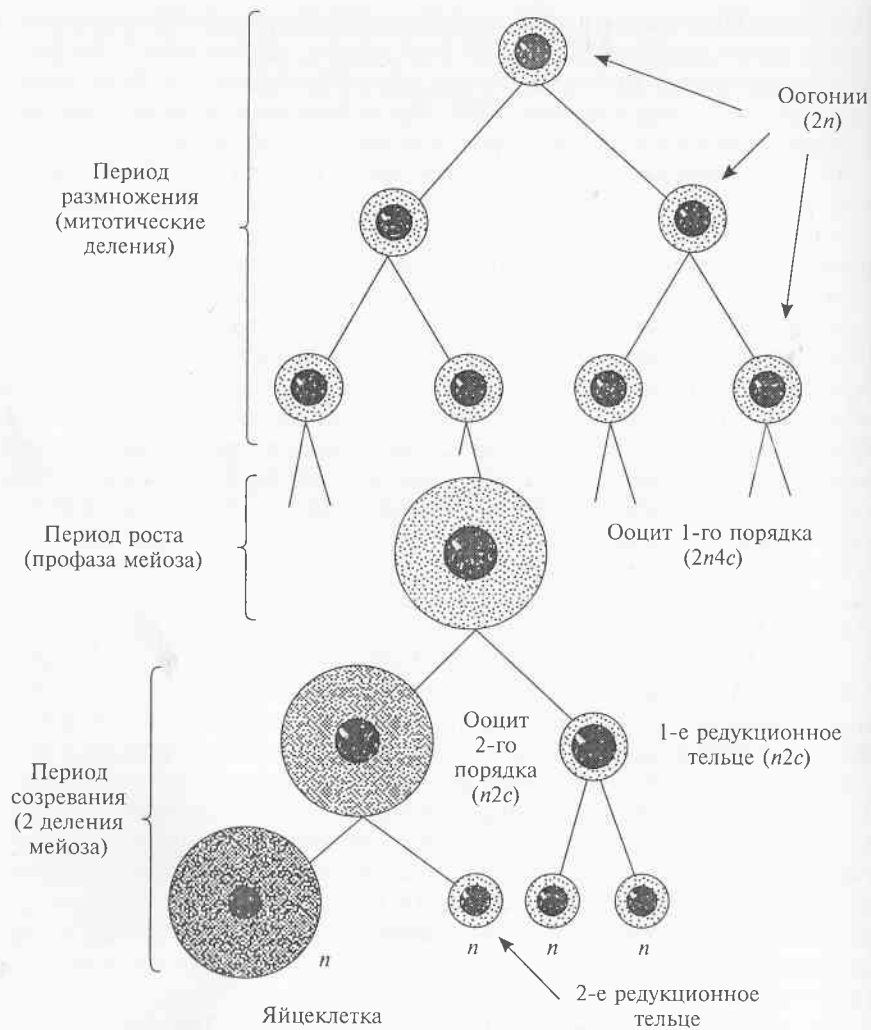


Рис. 14. Схема овогенеза

В **период размножения** диплоидные *оогонии* совершают определенное, характерное для данного вида число митотических делений, а затем переходят к стадии роста и становятся *ооцитами первого порядка* (ооцит I). Особенностью овогенеза, отличающей его от спермиогенеза, является меньшая митотическая активность оогониев. У высших позвоночных пролиферация оогониев происходит только в эмбриональный период и запас половых клеток (ооцитов) в яичниках взрослых самок не пополняется.

В **период роста** осуществляются одновременно два процесса: в ядре происходит профаза мейоза, а в цитоплазме растущего ооцита I накапливаются органеллы, питательные вещества, источники энергии, необходимые для обеспечения потребностей зародыша. Рост ооцита неравномерен. Вначале он незначителен, пропорционально увеличиваются объемы ядра и цитоплазмы. В цитоплазме накапливаются РНК, белки, рибосомы, органеллы. Этот этап называется *малым ростом*, или *превителлогенезом*, он совпадает с моментом вступления ооцита в *профазу мейоза* и продолжается до середины *диплотены*. В ядре происходят события, связанные с конъюгацией гомологичных хромосом и кроссинговером. Приблизительно с середины диплотены ооциты I вступают в *период большого роста*, или *вителлогенеза*, при этом резко увеличивается объем цитоплазмы (в сотни и тысячи раз) и она постепенно заполняется желточными включениями. Помимо желтка в ооците в этот период откладываются в резерв и другие компоненты — углеводы, липиды, рибосомы, но основным событием периода большого роста является вителлогенез. Желток представляет собой смесь компонентов (белки, жиры, углеводы), основной из них белок *вителлогенин*. По происхождению он может быть эндогенным, синтезируемым самим ооцитом, и экзогенным. В последнем случае желток синтезируется в печени или жировом теле и поступает в ооцит путем рецепторного эндоцитоза. У большинства животных желточные белки относятся к экзогенным, эндогенный синтез желтка обнаружен у кишечнополостных, моллюсков, иглокожих и др. В цитоплазме ооцитов желток запасается в виде гранул округлой или овальной формы либо в форме пластин.

К животным с двойным происхождением желтка относятся ракообразные, низшие насекомые, некоторые кольчатые черви и др. В этом случае ооцит способен объединять ауто- и гетеросинтетические макромолекулы и откладывать их в виде желточных гранул.

Синтез вителлогенина происходит в печени. Из него в ооците образуется вителлин, состоящий из липовителлина и фосфитина. Вителлогенин поступает в ооцит путем пиноцитоза, в цитоплазме пиноцитозные пузырьки сливаются и образуются гранулы примордиального желтка. К ним присоединяются элементы аппарата Гольджи и формируются дефинитивные желточные гранулы. Постепенно почти весь ооцит заполняется желточными и липидными включениями, за исключением цитоплазмы вокруг ядра и по периферии. При этом ооцит достигает окончательных размеров, увеличиваясь в объеме в тысячи раз.

Период созревания — заключительный этап овогенеза — осуществляется в виде двух последовательных делений созревания. В результате первого деления мейоза реплицированные гомологичные хромосомы расходятся в дочерние ядра, каждое из которых содержит половину исходного числа хромосом. В результате второго

деления созревания в сестринских клетках оказывается гаплоидное число одиночных хроматид.

Особенностью делений созревания в оогенезе является асимметричное разделение цитоплазмы: при каждом делении почти вся цитоплазма остается в одной из сестринских клеток, тогда как в другой ее объем ничтожен. При первом делении образуются большой *ооцит второго порядка* (ооцит II) и маленькое *первое редукционное тельце*. В цитоплазме ооцита содержится практически все, что накоплено в период роста. При втором делении созревания образуется *зрелое яйцо* с тремя редукционными тельцами, которые впоследствии обычно дегенерируют.

Оогенез отличается от сперматогенеза рядом цитологических особенностей:

1) число сперматогониальных делений в пределах одного вида всегда больше, чем оогониальных;

2) у высших позвоночных размножение оогоний происходит только в эмбриональный период развития;

3) период роста в оогенезе более длительный, он подразделяется на два этапа: малого и большого роста; объем ооцитов I при этом возрастает по сравнению со сперматоцитами I более значительно; в отличие от сперматогенеза трофические компоненты резервируются;

4) в процессе оогенеза отсутствует период формирования, аналогичный спермиогенезу — см. выше;

5) возможность блокады оогенеза на разных фазах мейотических делений, в соответствии с которыми выделяют четыре основных группы животных: мейоз блокируется до делений созревания (перед разрушением ядерной оболочки) — губки, плоские черви, круглые и кольчатые черви (первая группа); блокада мейоза происходит на метафазе первого деления созревания — некоторые моллюски, аннелиды, почти все насекомые (вторая группа); мейоз останавливается на метафазе второго деления созревания — почти все позвоночные животные (третья группа); мейоз осуществляется без остановки — некоторые кишечнорастворимые, иглокожие (четвертая группа). Для завершения мейоза в первых трех случаях необходима активация женской половой клетки к созреванию сперматозоидом.

Типы оогенеза

Развитие женских половых клеток может осуществляться в любом участке тела (*диффузный оогенез*) либо локализованно в женских гонадах — яичниках (*локализованный оогенез*). Диффузный тип оогенеза наблюдается у губок, кишечнорастворимых, ресничных червей. При диффузном типе оогенеза ооциты являются фагоцитиру-

ющими клетками, не синтезируют и не накапливают желточные включения, а растут за счет поступления низкомолекулярных соединений из фаголизосом. В этих ооцитах вырабатываются в большом количестве гидролитические ферменты, необходимые для переваривания фагоцитируемых структур.

В случае локализованного оогенеза ооцит может развиваться без участия вспомогательных питающих клеток (*солитарный тип*) или при участии специальных клеток (*алиментарный тип*). При солитарном типе оогенеза растущие половые клетки лишены вспомогательных элементов, желточные белки и РНК синтезируются ими самостоятельно. Все необходимое для макромолекулярных синтезов ооцит получает из окружающей среды (полости гонады) в виде простых низкомолекулярных соединений. Солитарный оогенез встречается у некоторых кишечнорастворимых, червей и моллюсков.

Алиментарный тип оогенеза может быть фолликулярным или нутриментарным. При *фолликулярном типе оогенеза* растущий ооцит окружен фолликулярными (соматическими по происхождению) клетками, которые вместе с ним образуют функциональную структуру — *фолликул* (см. рис. 14). Это наиболее распространенный тип оогенеза. Он встречается у подавляющего большинства животных, к числу которых относятся все хордовые. Фолликулярные клетки не участвуют в синтезе белков желтка, все виды РНК синтезируются в самом ооците. Исключение составляют фолликулярные клетки птиц и ящериц, синтезирующие РНК для ооцита. Среди многочисленных функций фолликулярного эпителия — проведение и селекция гетеросинтетических макромолекул, защитная, регуляторная, синтез вторичных оболочек и др. При *нутриментарном типе оогенеза* ооцит окружен *трофоцитами* (клетками-кормилками), связанными с ним цитоплазматическими мостиками. Трофоциты — abortивные половые клетки, т.е. имеющие общее происхождение с ооцитом. На один ооцит приходится огромное количество клеток-кормилок, снабжающих половую клетку РНК. В вителлогенезе трофоциты участия не принимают: желток образуется за счет поступлений высокомолекулярных веществ извне. У некоторых насекомых нутриментарный тип питания сочетается с фолликулярным. В этих случаях фолликулярные клетки окружают ооцит вместе с его клетками-кормилками еще одним слоем. Нутриментарный оогенез описан у высших червей и насекомых.

Препараты к занятию «Оогенез»

Препараты, рекомендуемые к этому занятию, иллюстрируют цитологические особенности оогенеза у костистых рыб и фолликулогенеза млекопитающих.

Оогенез костистых рыб рассмотрен на примере мозамбикской теляпии (*Oreochromis mossambicus* P.), но на занятиях могут быть использованы препараты других видов костистых рыб, широко распространенных в реках Российской Федерации и имеющих порционный тип икротетания (например, леща) или препараты яичника тропической костистой рыбы *Danio rerio*, которая содержится в аквариумах и часто используется в эмбриологических исследованиях.

Фолликулогенез у млекопитающих предлагаем изучить на примере яичника кролика или домашней кошки. Для данных видов характерна овуляция, индуцируемая спариванием. Это дает возможность получить от животных в эструсе препараты с антральными фолликулами.

Препарат № 1. Яичник костистой рыбы (гистологический срез)

Задание. Данный препарат мозамбикской теляпии (*Oreochromis mossambicus* P.) (рис. 15) представляет собой срез яичника костистой рыбы, на котором видны соматические элементы гонады и ооциты первого порядка на разных этапах малого роста (превителлогенеза) и большого роста (вителлогенеза). (Соматические элементы гонады, в том числе и фолликулярные клетки, видны как тонкие пленки, и их морфология не представляет интереса для студенческого практикума.) При малом увеличении микроскопа (объектив $\times 8$) найдите ооциты на стадиях малого роста, раннего и позднего большого роста, у которых на срез попало ядро, рассмотрите и зарисуйте их (рис. 15, А). На стадии малого роста отметьте форму ооцита и окраску цитоплазмы. У ооцитов на разных стадиях большого роста обратите внимание на распределение вакуолей и гранул желтка в цитоплазме (рис. 15, Б, Г). Переведя объектив микроскопа на среднее увеличение (объектив $\times 20$), зарисуйте краевые зоны ядер с амплификационными ядрышками (рис. 15, В).

Ооциты на завершающих этапах большого роста могут в десятки раз превышать в диаметре ооциты на стадии малого роста. В этом случае можно зарисовать не весь срез ооцита, а только его сектор.

Основным признаком половых клеток в *превителлогенный период* является *отсутствие желточных включений* в цитоплазме. На стадии диплотены ооцит первого порядка вступает в период малого роста, который осуществляется за счет увеличения объемов ядра и цитоплазмы. Ядро занимает центральное положение, контуры его ровные. Многочисленные ядрышки расположены по краю ядерной оболочки. Цитоплазма гомогенно окрашена и имеет мел-

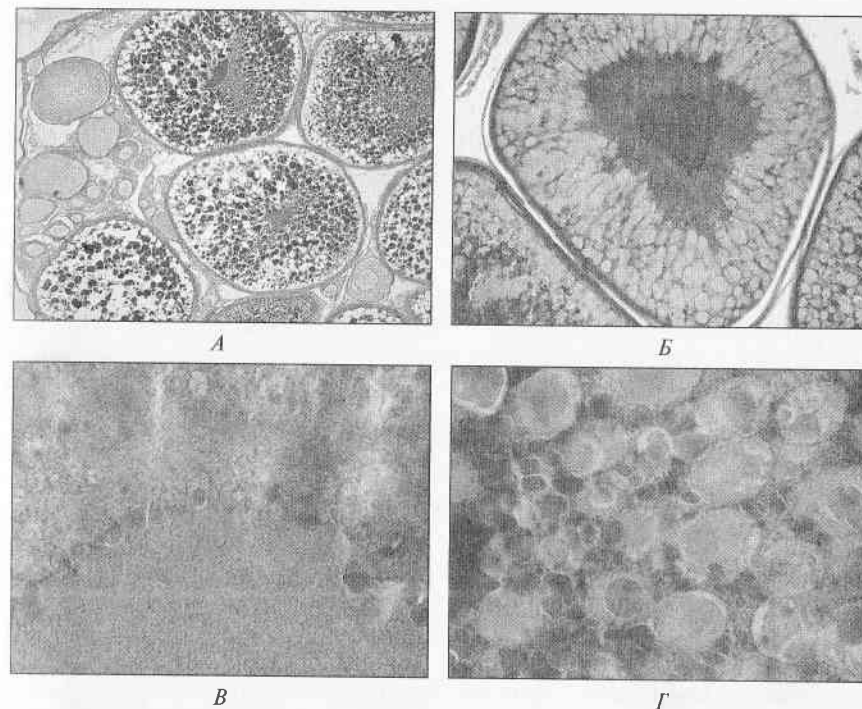


Рис. 15. Гистологический срез яичника костистой рыбы:

А — общий вид (объектив $\times 10$); Б — начало большого роста (объектив $\times 20$); В — ядрышки на периферии ядра; Г — заполнение цитоплазмы ооцита желточными и липидными включениями

козернистое строение. Вокруг ооцита формируется однослойная фолликулярная оболочка.

Начало большого роста характеризуется резким увеличением размеров клетки за счет возрастания объема цитоплазмы. Ядро образует многочисленные выступы в цитоплазму, значительно увеличивается количество краевых ядрышек. В периферической области цитоплазмы появляются вакуоли — предшественники кортикальных гранул, содержащих мукополисахариды и белки. Вакуоли будут иметь важное значение при оплодотворении. Появление вакуолей знаменует переход ооцита из малого в большой рост, предшествует появлению желточных гранул. Эту стадию считают пограничной между пре- и вителлогенезом и обозначают как *стадию вакуолизации*.

Далее в *период большого роста* цитоплазма ооцита постепенно заполняется желтком и другими включениями.

На протяжении вителлогенеза завершается образование оболочки ооцита. Хорошо заметны *лучистая оболочка (zona radiata)*,

пронизанная выростами ооцита и фолликулярных клеток, хорион, образованный фолликулярным окружением, и *однослойная фолликулярная оболочка*, клетки которой расположены черепицеобразно.

Снаружи образуется соединительнотканная оболочка. Яйцевые оболочки у костистых рыб непроницаемы для сперматозоидов, поэтому в них формируется *микропиле* (см. рис. 82).

Препарат № 2. Яичник кролика (гистологический срез)

Задание. На предлагаемом препарате (рис. 16) изучаются последовательные этапы формирования фолликулов, особенности строения различных фолликулов и расположение их в гонаде. Для этого рассмотрите препарат под микроскопом при малом увеличении (объектив $\times 8$) и схематично зарисуйте корковую и мозговую область, а также расположение фолликулов разного диаметра в корковой области (рис. 16, А). Переведя микроскоп на большое увеличение (объектив $\times 40$), зарисуйте группу примордиальных фолликулов (обратите внимание на соотношение ядра и цитоплазмы ооцитов и на форму фолликулярных клеток, их окружающих). Переведите микроскоп на среднее увеличение (объектив $\times 20$) и зарисуйте первичный и вторичный фолликулы (обратите внимание на ориентацию фолликулярных клеток, непосредственно окружающих ооцит, и на начало формирования текальных оболочек фолликула). Найдите и зарисуйте третичный фолликул. На всех рисунках укажите расположение прозрачной оболочки ооцита.

Оогенез у млекопитающих относится к алиментарному фолликулярному типу, развитие женских половых клеток осуществляется при активном участии фолликулярных клеток. На поперечных срезах яичника различимы *корковое вещество (cortex)*, в котором находятся фолликулы всех стадий развития, и *мозговое вещество (medulla)*, в котором проходят крупные сосуды яичника. Схема строения яичника млекопитающих и его фолликулярной системы представлена на рис. 17.

У млекопитающих первый этап оогенеза — размножение гоний — происходит в эмбриональный период. Впервые половая клетка устанавливает связи с фолликулярными, когда вступает в период малого роста (медленная стадия) и превращается в ооцит первого порядка. В это время в ее ядре начинается профазы мейоза, но не завершается, а блокируется на стадии диплотены. Возникший *примордиальный* фолликул состоит из ооцита первого порядка на стадии диплотены и окружающих его уплощенных фолликулярных клеток (см. рис. 16, Б). Примордиальные фолликулы —

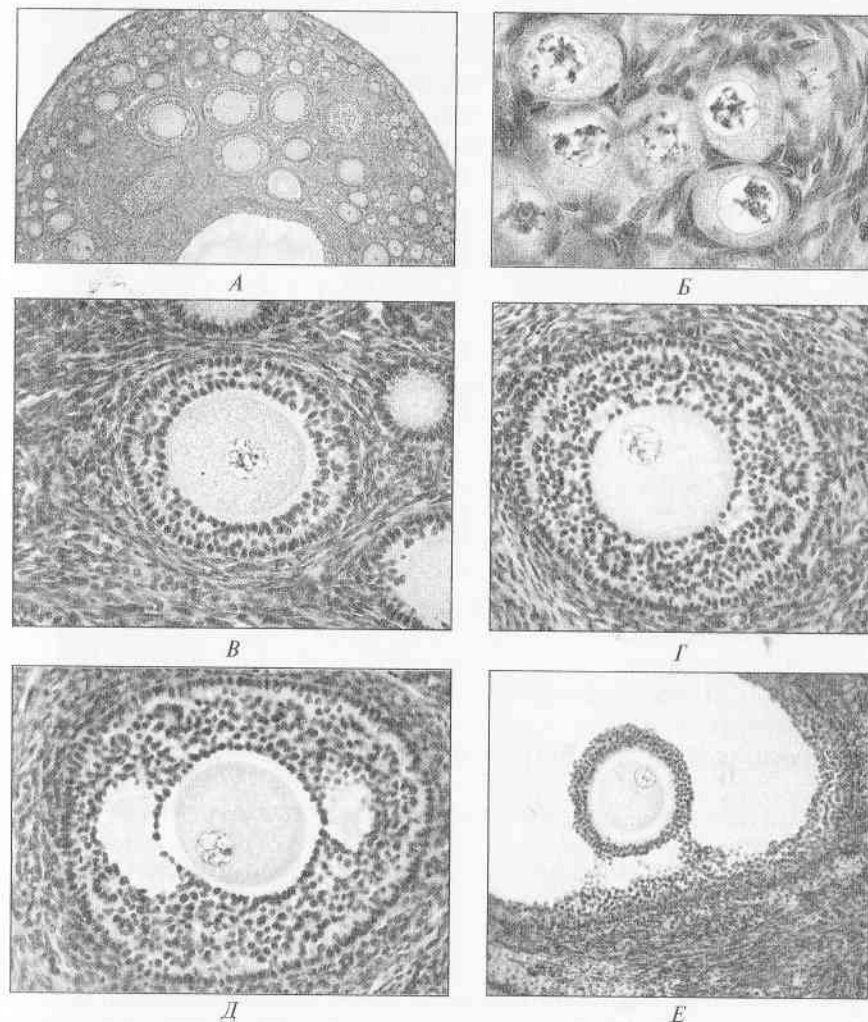


Рис. 16. Гистологический срез яичника кролика:

А — общий вид: расположение фолликулов в корковой зоне яичника (объектив $\times 10$); Б — группа примордиальных фолликулов на периферии корковой зоны яичника (объектив $\times 100$); В — первичный многослойный фолликул (объектив $\times 40$); Г — ранний вторичный фолликул: начало формирования лакун (объектив $\times 40$); Д — вторичный фолликул (объектив $\times 40$); Е — третичный фолликул (объектив $\times 20$)

это резерв половых клеток, в которых завершение профазы мейоза и дальнейшее развитие происходят лишь при половом созревании. Располагаются они, как правило, группами в самых поверхностных участках корковой области яичника, непосредственно под оболочкой (генерация покоящихся фолликулов).

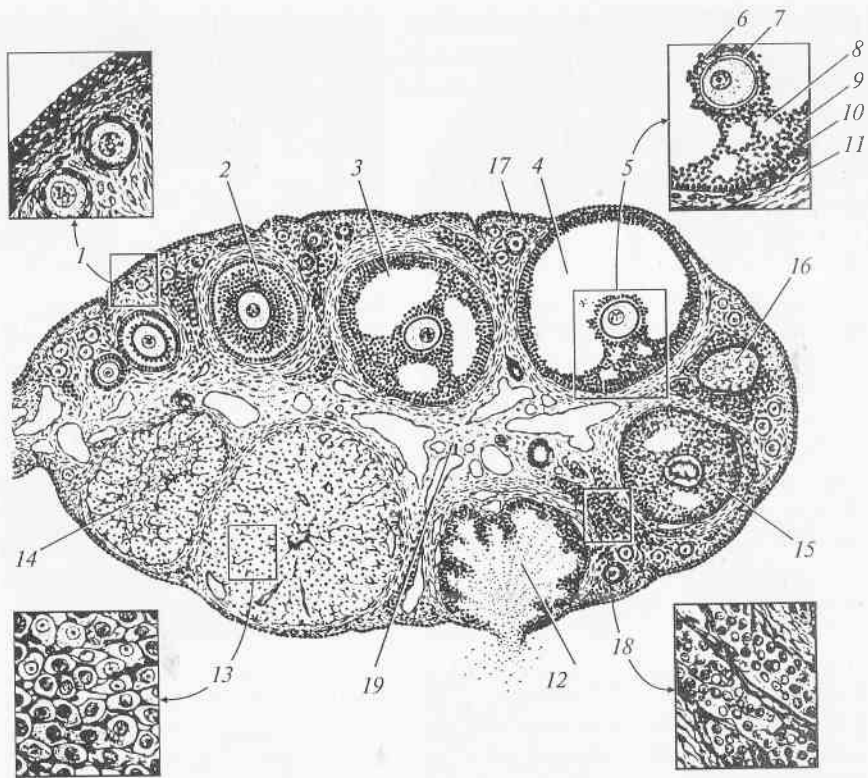


Рис. 17. Схема строения яичника млекопитающих:

1 — примордиальный фолликул в корковом веществе; 2 — растущий (первичный) фолликул; 3 — фолликул с образующимися полостями (вторичный фолликул); 4 — граафов пузырь (третичный фолликул); 5 — яйценосный бугорок (cumulus oophorus); 6 — лучистый венец (corona radiata); 7 — блестящая оболочка (zona pellucida); 8 — ножка яйценосного бугорка; 9 — зернистая оболочка фолликула (zona granulosa); 10, 11 — соединительнотканнные оболочки фолликула (theca interna, theca externa); 12 — овуляция; 13 — активное желтое тело (corpus luteum); 14 — дегенерирующее желтое тело; 15, 16 — атрезия (дегенерация) фолликулов; 17 — оболочка яичника; 18 — корковая зона; 19 — мозговая зона

Примордиальные фолликулы порциями вступают в рост в течение всей жизни самки. При инициации развития фолликулярные клетки начинают пролиферировать, из плоских превращаются в кубические, а затем в призматические и покрывают ооцит первого порядка сначала одним слоем, затем двумя, тремя и т. д. Возникший фолликул носит название *первичного*. Вначале он однослойный, а затем постепенно превращается в многослойный первичный фолликул (рис. 16, В).

Фолликулярная оболочка многослойного фолликула называется *зернистой* (zona granulosa), снаружи от нее начинает формиро-

ваться *соединительнотканная оболочка* (teca folliculi). После того как вокруг ооцита первого порядка завершается образование первого слоя фолликулярных клеток, между ними при совместном участии ооцита и окружающих его фолликулярных клеток начинается формироваться *блестящая оболочка* (zona pellucida). Ее наружная часть, состоящая из кислых мукополисахаридов, секретруется фолликулярными клетками, а внутренняя, содержащая нейтральные мукополисахариды, образуется ооцитом первого порядка. Эту оболочку пронизывают микровыросты ооцита и макровыросты фолликулярных клеток. Первичный фолликул увеличивается в объеме, как за счет увеличения размера самого ооцита, так и за счет увеличения числа клеток фолликулярного окружения, которые активно делятся в течение всего периода роста фолликула.

Дальнейшее развитие фолликула заключается в появлении между фолликулярными клетками полостей, заполненных фолликулярной жидкостью и имеющих тенденцию к слиянию (рис. 16, Г). После образования полостей фолликул получает название *вторичного фолликула* (рис. 16, Д). Ооцит, находящийся в нем, все еще остается на стадии диплотены профазы мейоза. До тех пор пока продолжается рост самого ооцита первого порядка, фолликул остается компактным. Затем рост ооцита прекращается, а фолликул продолжает активно увеличиваться за счет пролиферации клеток зернистой оболочки и образования полостей. При слиянии полостей в общую центральную полость (*antrum*) образуется *третичный фолликул*, или *граафов пузырек* (рис. 16, Е). Это завершающий этап фолликулогенеза.

Зрелый фолликул состоит из нескольких клеточных слоев. В том месте, где расположен ооцит, поддерживающие его клетки образуют выпячивание внутрь полости фолликула — *яйценосный бугорок* (cumulus).

Ооцит окружен *блестящей оболочкой* (zona pellucida) и *лучистым венцом* (corona radiata). Полость фолликула ограничена *зернистой оболочкой* (zona granulosa). Снаружи фолликул покрыт тонкой базальной мембраной и текальной оболочкой, состоящей из внутренней части (*teca interna*), содержащей сосуды, и наружной (*teca externa*), в состав которой входят стромальные и мышечные клетки (см. рис. 16, Е и 17).

Фолликулярные клетки играют роль не только опорных, ограничительных, трофических элементов, но вместе с текальными элементами являются железой внутренней секреции, вырабатывающей эстроген (женский половой гормон). Кроме того, на них расположены рецепторы к гонадотропным гормонам гипофиза, под воздействием которых осуществляются развитие фолликулов и оогенез.

Граафов пузырек на завершающих стадиях формирования быстро увеличивается в размерах, приближается к поверхности яич-

ника и его верхушка (стигма) выдается над ней. Последующие события связаны с разрывом стенки фолликула в области стигмы и выбросом фолликулярной жидкости вместе с ооцитом, окруженным блестящей оболочкой и лучистым венцом из фолликула. Процесс разрыва фолликула и освобождения ооцита называется овуляцией. У большинства млекопитающих она происходит на стадии метафазы второго деления созревания ооцита. Завершение второго деления созревания, при котором образуются яйцеклетка и второе редукционное тельце, происходит лишь в процессе оплодотворения.

ЗАНЯТИЕ 3

ОПЛОДОТВОРЕНИЕ

Начальные процессы при оплодотворении

В зрелых половых клетках практически все жизненные процессы подавлены. Клетки фактически находятся в анабиотическом состоянии, и только процесс оплодотворения у большинства видов животных при нормальном развитии является толчком к стремительному выходу яйцеклетки из анабиоза. Существует несколько определений процесса оплодотворения. Оплодотворение представляет собой процесс слияния двух половых клеток (гамет) друг с другом, в результате чего возникает новая особь, генетические потенции которой берут начало от обоих родителей. Согласно другому определению, оплодотворение есть побуждение яйца к развитию, вызванное сперматозоидом, одновременно с передачей яйцу наследственного материала отца. Таким образом, можно говорить о том, что оплодотворение осуществляет две основные функции: половую (комбинирование генов двух родителей) и репродуктивную (создание нового организма), последняя включает инициацию в цитоплазме яйца главным образом тех реакций, которые позволяют продолжать развитие.

Конкретные особенности оплодотворения сильно варьируют у различных видов животных, но происходящие при этом события обычно сводятся к трем основным процессам:

1) процессам, происходящим до соприкосновения спермия и яйцеклетки — так называемое *дистантное взаимодействие гамет* (этап качественного контроля гамет);

2) процессам, протекающим при непосредственном соприкосновении поверхностей гамет — *контактное взаимодействие гамет* (этап количественного контроля);

3) процессам, протекающим после вхождения сперматозоида в яйцеклетку — *слияние генетического материала спермия и яйца и активация метаболизма яйца* для вступления на путь развития.

Дистантное взаимодействие гамет направлено на повышение вероятности встречи сперматозоида с яйцеклеткой. При наружном осеменении многие животные выметывают гаметы непосредственно в окружающую среду — воду. Одновременно туда же могут выметывать половые продукты представители различных видов, поэтому животным необходимы механизмы, препятствующие оплодотворению яйцеклеток одного вида спермиями другого вида. Другая проблема — низкая концентрация спермиев в окружающей среде.

Для решения этих проблем в процессе эволюции сформировались два механизма: *видоспецифическое привлечение спермиев* и их *видоспецифическая активация*.

Видоспецифическое привлечение осуществляется посредством *хемотаксиса* — движения сперматозоидов по градиенту концентрации некоторых специфических веществ, выделяемых яйцеклеткой. Это было доказано для многих животных, в том числе для кишечнополостных, моллюсков, иглокожих и первичнохордовых. Было показано, что яйца кишечнополостного *Orthopyxis caliculata* не только секретируют хемотаксический фактор, но и способны регулировать время его выделения. Механизмы хемотаксиса различны.

В 80-х годах XX в. из яиц морского ежа было выделено два специфических хемотаксических агента — пептиды *сперакт* и *резакт*. *Сперакт*, выделенный из яиц *Strongylocentrotus purpuratus*, состоит из 10 аминокислотных остатков. *Резакт*, выделенный из студенистой оболочки яиц *Arbacia punctulata*, содержит 14 аминокислотных остатков. У млекопитающих, когда оплодотворение происходит в верхних отделах яйцевода, основная роль в дистантном взаимодействии гамет отводится явлению *реотаксиса* — способности спермиев двигаться против встречного течения жидкости в маточных трубах.

Контактное взаимодействие гамет состоит из нескольких последовательных этапов. Первый из них — *акросомная реакция*. Ее последовательные этапы наиболее полно изучены у морского ежа. Акросомную реакцию сперматозоидов этого вида инициируют сульфатированные полисахариды студенистой оболочки яйца. Они вызывают поступление ионов кальция и натрия в головку спермия и замещение ими ионов калия и водорода. Ионное замещение вызывает целый комплекс внутриклеточных процессов (рис. 18). Акросомная реакция может быть вызвана и неспецифическим воздействием, например механическим (соударением сперматозоида с любой твердой поверхностью), или при искусственном повышении концентрации ионов кальция в окружающей среде.



Рис. 18. Схема событий, происходящих при контакте сперматозоида со студенистой оболочкой яйцеклетки морского ежа

В самом начале акросомной реакции происходит слияние наружной мембраны акросомы с плазматической мембраной сперматозоида и последующий разрыв этих мембран, сопровождающийся экзоцитозом содержимого акросомного пузырька. Изливающиеся из разрушенной акросомы спермиолизины растворяют третичную оболочку яйцеклетки. В результате выхода ионов водорода из головки спермия наступает следующий этап акросомной реакции — образование *акросомного выроста*. Это осуществляется за счет того, что внутренний участок мембраны акросомы начинает выпячиваться вследствие полимеризации глобулярного актина и образования актиновых микрофиламентов. До активации спермия полимеризация актина, вероятно, блокирована регуляторным белком, а увеличение внутриклеточного рН снимает этот блок.

Акросомный вырост вступает в контакт с наружной поверхностью яйцеклетки — желточной оболочкой. Именно этот момент является решающим для взаимного «*видоспецифического*» узнавания яйцеклетки и сперматозоида. Это узнавание осуществляется благодаря комплементарному взаимодействию особого белка *биндина*, встроенного в мембрану акросомного выроста (бывшей внутренней мембраны акросомного пузырька) с соответствующим рецептором на желточной оболочке яйцеклетки. Впервые биндин был выделен из акросомы спермиев *Strongylocentrotus purpuratus*. Он представляет собой нерастворимый белок с молекулярной массой 30 500 Да, имеющий видоспецифические различия. Проведенные биохимические исследования показали, что биндины близкородственных видов морских ежей различны. В свою очередь из желточных оболочек яиц морских ежей был выделен крупный гликопротеиновый комплекс, который специфическим образом связывал биндин.

Следующий этап процесса оплодотворения — **реакция активации метаболизма яйцеклетки**. Вслед за реакцией видоспецифического узнавания (образования комплекса между биндином и его рецептором на желточной оболочке яйцеклетки) образуется бугорок оплодотворения. С началом этого процесса можно говорить об активации яйцеклетки. Формирование бугорка оплодотворения сопровождается (как и в случае формирования акросомного выроста) полимеризацией актина. Мембраны верхушки акросомной нити и бугорка оплодотворения сливаются и образуют канал, по которому содержимое сперматозоида поступает в яйцеклетку. Участок мембраны сперматозоида встраивается в мембрану яйцеклетки, где может сохраняться длительное время (у морского ежа иммунохимическими методами этот участок мембраны сперматозоида был обнаружен на стадии личинки).

Дальнейшая реакция активации яйцеклетки связана с функционированием *инозитолфосфатной системы*, все компоненты ко-



Рис. 19. Схема событий, происходящих при контакте сперматозоида с плазматической мембраной яйцеклетки морского ежа в процессе оплодотворения

торой в неактивном состоянии присутствуют в плазматической мембране яйцеклетки.

Инозитолфосфатная система контролируется белковыми компонентами, локализованными на плазматической мембране яйцеклетки, которые изменяют свою конформацию после взаимодействия биндина с мембранным рецептором. Такими компонентами являются G-белок и фосфолипаза С. После контакта сперматозоида с плазматической мембраной яйцеклетки в первые секунды независимо от инозитольной системы регуляции резко повышается проницаемость плазматической мембраны яйцеклетки для ионов Na^+ , что в конечном итоге обеспечивает *быстрый блок полиспермии* (рис. 19).

Основными компонентами инозитолфосфатной системы являются производное углевода инозита — фосфатидилинозитол-4,5-дифосфат (PIP) и фермент фосфолипаза С. Под действием фосфолипазы С фосфатидилинозитол-4,5-дифосфат расщепляется на две составляющие: диацилглицерол (DAG) и инозитолтрифосфат (IP_3). Диацилглицерол остается в плазматической мембране яйцеклетки, а инозитолтрифосфат выходит в цитоплазму яйцеклетки. *Диацилглицерол* с помощью другого мембранного фермента — протеинкиназы С — оказывает влияние на Na^+/H^+ -обменник, обеспечивая отток ионов H^+ из цитоплазмы и повышение концентрации ионов Na^+ в яйцеклетке. Отток ионов H^+ из цитоплазмы приводит к повышению внутриклеточного pH, что в свою очередь стимулирует ускорение синтеза белка в цитоплазме яйцеклетки и синтез ДНК в мужском и женском ядрах.

В свою очередь *инозитолтрифосфат*, выходящий из мембраны в цитоплазму яйцеклетки, воздействует на эндоплазматический

ретикулум — внутриклеточное «депо» кальция и усиливает высвобождение ионов Ca^{2+} в цитоплазму. Выход Ca^{2+} в цитоплазму активирует целый ряд метаболических реакций. Одна из них заключается в увеличении потребления яйцом кислорода. Интересен тот факт, что такое потребление кислорода практически не связано с митохондриями, которые используют его для синтеза АТФ. Вероятнее всего, кислород используется для окисления таких компонентов яйца, как, например, оболочка оплодотворения. Одновременно окисляются различные липиды цитоплазмы. Кроме того, ионы Ca^{2+} , как и повышение внутриклеточного pH, оказывают влияние на интенсивность синтеза ДНК в мужском и женском ядрах. Другим кальцийзависимым эффектом является активация фермента НАД⁺-киназы, которая превращает НАД⁺ в НАДФ⁺, что в конечном итоге обеспечивает синтез новых липидных компонентов плазматической мембраны, необходимых для последующего процесса дробления (рис. 20).

И наконец, повышение концентрации ионов Ca^{2+} в цитоплазме яйцеклетки приводит к экзоцитозу кортикальных альвеол — кортикальной реакции, которая создает *медленный блок полиспермии*. Кортикальные альвеолы — это многочисленные пузырьки, содержащиеся в кортикальном слое неоплодотворенной яйцеклет-



Рис. 20. Схема событий, происходящих при последовательной активации фосфолипазы С и протеинкиназы, приводящих к изменению внутриклеточного pH в оплодотворенной яйцеклетке

ки. При экзоцитозе кортикальных альвеол (*кортикальной реакции*) (рис. 21) из них в пространство между плазматической мембраной яйцеклетки и плотно прилегающей к ней желточной оболочкой высвобождаются следующие вещества:

- вителлиновая деламиназа — протеолитический фермент, разрывающий связи между плазматической мембраной и желточной оболочкой;

- сперморецепторная гидролаза — протеолитический фермент, освобождающий осевшую на желточной оболочке сперму от связей с этой оболочкой;

- гликопротеид, который насыщает воду в пространство между желточной оболочкой и плазматической мембраной, вызывая тем самым их расслоение и образование перивителлинового пространства между ними;

- фактор, способствующий затвердению желточной оболочки, которую теперь называют *оболочкой оплодотворения*;

- у иглокожих, кроме того, из кортикальных альвеол высвобождается структурный белок гиалин, который участвует в формировании гиалинового слоя, располагающегося под плазматической мембраной.

Таким образом, активация яйцеклетки включает комплекс протекающих в ней реакций, которые затрагивают практически все компоненты яйца.

Поздние реакции оплодотворения включают активацию синтеза ДНК и белкового синтеза. Известно, что еще в период оогенеза

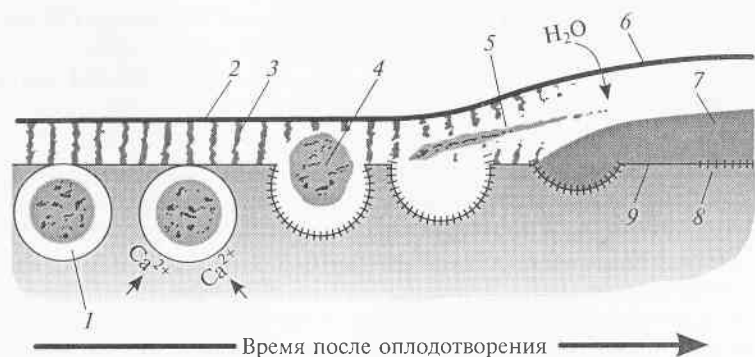


Рис. 21. Экзоцитоз кортикальных гранул морского ежа при оплодотворении: 1 — кортикальная гранула; 2 — оболочка ооцита; 3 — связи, соединяющие желточную оболочку с плазматической мембраной ооцита; 4 — начало процесса экзоцитоза; 5 — ферменты кортикальных гранул расщепляют связи желточной оболочки и ооцита, образуется перивителлиновое пространство; 6 — оболочка оплодотворения; 7 — гиалиновая оболочка (характерная особенность ранних эмбрионов иглокожих); 8 — мембрана кортикальной гранулы; 9 — мембрана ооцита

неза в самой яйцеклетке запасается большое количество мРНК, до активации находящейся в заблокированном состоянии. В результате комплекса процессов, происходящих при активации яйца (повышение концентрации Ca^{2+} , повышения внутриклеточного pH), происходит деблокирование функции мРНК и начинается интенсивный синтез белка. Такое резкое повышение белкового синтеза начинается уже через несколько минут после проникновения сперматозоида в яйцеклетку. Итак, можно говорить, что интенсивность белкового синтеза не зависит от синтеза новых мРНК в яйцеклетке, а определяются наличием уже запасенных «материнских» мРНК.

Первый и второй блоки мейоза

Полное завершение мейоза без участия сперматозоида, внедряющегося в яйцеклетку, происходит лишь у немногих видов животных (некоторые кишечнорастворные, иглокожие — морской еж). У большинства животных он останавливается в конце профазы (как правило, на стадии диплотены-диакинеза). В этом случае говорят о наступлении первого блока мейоза, который у многих позвоночных может продолжаться годами.

Первый блок мейоза снимается во время овуляции. Однако и после этого мейоз все же не доходит до конца — наступает второй блок мейоза (послеовуляторный блок), краткосрочный. Для завершения мейоза необходимо снять этот блок активирующим агентом. В роли такого агента могут выступать сперматозоид, изменение солевого состава окружающей среды, механическое воздействие и т.д.

Всех животных можно поделить на три группы в зависимости от того, как эти остановки мейоза накладываются на процессы овуляции и оплодотворения:

- 1) мейоз останавливается один раз — на стадии диакинеза и снимается при оплодотворении (губки, некоторые представители плоских, круглых и кольчатых червей, моллюски и т.д.);

- 2) первый блок мейоза наступает на стадии диплотены-диакинеза профазы мейоза и снимается во время овуляции; второй блок мейоза наступает на метафазе первого деления созревания и снимается при оплодотворении (некоторые губки, немуртины, моллюски, практически все насекомые; к такому типу блока мейоза относятся также яйцеклетки млекопитающих — собаки, лисицы и лошади, у которых первый блок мейоза наступает еще в эмбриональный период развития);

- 3) первый блок мейоза наступает на стадии диплотены-диакинеза профазы мейоза также в эмбриональный период развития и снимается овуляцией; второй блок мейоза наступает на стадии

метафазы второго деления созревания, т. е. уже после выделения первого полярного тельца (практически все хордовые; у летучих мышей второй блок мейоза приходится на анафазу второго деления созревания).

Процессы, протекающие после вхождения сперматозоида в яйцеклетку

У большинства животных сперматозоид входит в яйцеклетку целиком, включая хвостовую часть; у некоторых видов жгутик остается на поверхности. Но даже если жгутик с окружающими его митохондриями проникли в яйцеклетку, они не играют никакой роли в процессах дальнейшего развития, а разрушаются в цитоплазме яйцеклетки. Митохондрии передаются зародышу только материнским организмом.

Попав в цитоплазму яйцеклетки, сперматозоид сразу же поворачивается шейкой по ходу дальнейшего движения. Хроматин в ядре сперматозоида деспирализуется. Ядерная оболочка распадается на мелкие пузырьки, что делает возможным воздействие цитоплазмы яйца на компактный хроматин спермия.

Белки, благодаря которым хроматин спермия сохраняет конденсированное неактивное состояние, заменяются на белки сходного типа яйцевого происхождения. Эта замена приводит к деконденсации хроматина спермия.

Хроматиновая масса удерживает остатки исходной оболочки сперматического ядра на своей поверхности. Вскоре по периферии этой массы выстраиваются новые мембранные пузырьки, которые соединяются с участками прежней оболочки и образуют новую оболочку мужского ядра. Ядро сперматозоида теперь называют *мужским пронуклеусом*.

Когда в яйцеклетке завершатся деления мейоза, хроматин ядра также деспирализуется. Женское ядро получает название *женского пронуклеуса*.

Прежде чем сблизиться, пронуклеусы проделывают сложные движения («танец пронуклеусов»). Сначала мужской пронуклеус движется внутрь яйца перпендикулярно поверхности и независимо от положения женского пронуклеуса. Этот отрезок пути называют «дорожкой проникновения». Затем оба пронуклеуса двигаются навстречу друг другу по «дорожке копуляции».

Движения мужского пронуклеуса осуществляются, по-видимому, благодаря «отталкиванию» микротрубочек, растущих от «мужской» центриоли, которая находится в непосредственной близости к мужскому пронуклеусу, от поверхностного слоя яйцеклетки. У морского ежа процесс сближения пронуклеусов продолжается около 1 ч.

На стадии пронуклеусов синтезируется ДНК и удваивается хромосомный набор за счет формирования сестринских хроматид. В конце стадии пронуклеусов начинается конденсация хромосом — идет подготовка к первому делению мейоза. Оболочка пронуклеусов разрушается и конденсированные биваленты занимают свои места на веретене первого деления мейоза. Таким образом, S-фаза первого клеточного цикла в жизни нового организма приходится на стадию пронуклеусов.

Ооплазматическая сегрегация

Непосредственно после проникновения сперматозоида в яйцеклетку или воздействия активирующего агента начинаются интенсивные перемещения цитоплазмы яйцеклетки. Такие перемещения, а в некоторых случаях и возможные расслоения цитоплазмы, носят название ооплазматической сегрегации. Перемещения играют решающую роль для дальнейшего развития зародыша: в результате ооплазматической сегрегации намечаются основные элементы его пространственной организации.

У различных видов животных ооплазматическая сегрегация протекает по-разному. У некоторых кишечнорастных происходит лишь расслоение цитоплазмы яйцеклетки (ооплазмы) на внешний ободок (эктоплазму) и внутреннюю массу (эндоплазму). Основная масса питательных веществ сосредоточена именно в эндоплазме. У морского ежа, например, до оплодотворения под всей поверхностью яйца рассеян красный пигмент эхинохром. После оплодотворения он концентрируется в виде пояса в экваториальной зоне.

В этих случаях сегрегационные процессы симметричны по меньшей мере относительно полярной оси яйца. Часто сегрегация нарушает полярную симметрию и приводит к выделению в яйцеклетке меридиональной плоскости, которая соответствует сагиттальной плоскости и проходящей в ней дорсовентральной оси будущего зародыша. Примером может быть яйцеклетка амфибий.

Решающим для определения дорсовентральности будущего организма является поворот оплодотворения. Он заключается в повороте в вертикальной плоскости примерно на 30° всего кортикального слоя яйцеклетки относительно внутренней массы желтка. Плоскость поворота совпадает с сагиттальной плоскостью, а направление — с вентродорсальным направлением: та сторона яйцеклетки, с которой частицы кортикального слоя опускаются, становится вентральной, а сторона, на которую они поднимаются, дорсальной.

Поворот оплодотворения контролируется цитоскелетными компонентами — микротрубочками. Применение микротрубочковых

ядов (колхицин и т. д.) подавляет поворот оплодотворения. Микротрубочки, которые осуществляют поворот оплодотворения, растут из центриоли, внесенной сперматозоидом. Микротрубочки, достигшие в процессе своего роста вегетативного кортекса, полимеризуются очень активно и погибают своими внешними концами (плюс-концами) по направлению будущего поворота кортекса. У ряда животных для ооплазматической сегрегации важное значение имеет сократимость актиновых микрофиламентов кортикального слоя яйцеклетки, которая активируется ионами Ca^{2+} .

Фотографии гистологических препаратов, в подробностях иллюстрирующих все этапы оплодотворения костистых рыб, приведены в разделе «Вьюн: работа с живым материалом».

Препараты к занятию «Оплодотворение»

Вхождение сперматозоида в яйцеклетку совершается у животных на разных стадиях развития яйцеклеток: у аскариды, птиц и некоторых млекопитающих оно происходит на стадии ооцита первого порядка, т. е. еще до выделения первого редукционного тельца. При раннем проникновении в яйцеклетку сперматозоид пребывает в состоянии покоя до тех пор, пока в ней не завершится мейоз. В результате слияния сперматозоида и яйцеклетки образуется зигота.

Студентам предлагается практически изучить основные этапы процесса оплодотворения на препаратах поперечных срезов матки лошадиной аскариды.

Встреча гамет у аскариды происходит внутри половых путей самки (внутреннее оплодотворение). После проникновения сперматозоида внутрь появляется оболочка оплодотворения, препятствующая проникновению в яйцеклетку других сперматозоидов.

Оплодотворенные ооциты от момента проникновения сперматозоида и до первых делений дробления находятся в матке аскариды, причем более поздние стадии находятся ближе к заднему концу матки.

Препарат № 1. Матка аскариды (поперечный срез): выделение первого редукционного тельца

Задание. На данном препарате под микроскопом при малом увеличении (объектив $\times 8$) рассмотрите и зарисуйте общий вид матки лошадиной аскариды на поперечном срезе.

Переведите микроскоп на большое увеличение (объектив $\times 40$) и найдите зиготу, на срезе которой видны деконденсирующаяся

головка спермия и веретено первого деления созревания, и зарисуйте его.

Снаружи матка покрыта покровными фолликулярными клетками, внутренняя полость заполнена оплодотворенными яйцеклетками (рис. 22, А). Ядро сперматозоида после попадания в яйцеклетку быстро набухает и увеличивается в объеме. В области расположения головки сперматозоида можно различить темную гранулу — это та область ядра сперматозоида, которая еще не подверглась деконденсации и ДНК которой плотно упакована и лежит компактно, как в ядре зрелого сперматозоида. Вокруг ядра спермия виден ореол уже деконденсированного материала (рис. 22, Б). Обратите внимание на то, что оболочка ооцита на этом этапе еще не отошла от его плазматической мембраны, т. е. оболочка оплодотворения еще не сформирована, а цитоплазма ранней зиготы сильно вакуолизирована. Если срез прошел вдоль веретена первого деления созревания (рис. 22, Б), определите его этап (метафаза, анафаза или телофаза первого деления созревания) и подсчитайте количество хромосом.

Препарат № 2. Матка аскариды (поперечный срез): выделение второго редукционного тельца и образование оболочки оплодотворения

Задание. На данном препарате под микроскопом при малом увеличении (объектив $\times 8$) выберите и поставьте в поле зрения зиготу или группу зигот, в которых отчетливо различимо содержимое (материал ядра сперматозоида, веретено второго деления созревания, первое редукционное тельце). Переменив малое увеличение на большое (объектив $\times 40$), рассмотрите строение зиготы аскариды на стадии выделения второго полярного тельца (рис. 22, В).

Обратите внимание на отличия данной стадии от стадии оплодотворения, представленной на препарате № 1. На препарате четко видно, что на этой стадии уже образовалось перивителлиновое пространство и оболочка оплодотворения отошла от зиготы. Зигота имеет мелкозернистую цитоплазму, в которой лежит деконденсирующаяся головка сперматозоида.

На этом этапе оплодотворения деконденсация почти завершилась: темная головка спермия уже не видна, а область хроматина мужского ядра большего диаметра и более плотная, чем на препарате № 1. На периферии зиготы так же, как и на препарате № 1, видно веретено деления, но это веретено второго деления созревания. Первое редукционное тельце, являющееся результатом первого деления созревания, видно как темное мелкое образование, прилежащее оболочке оплодотворения. Такое расположение пер-

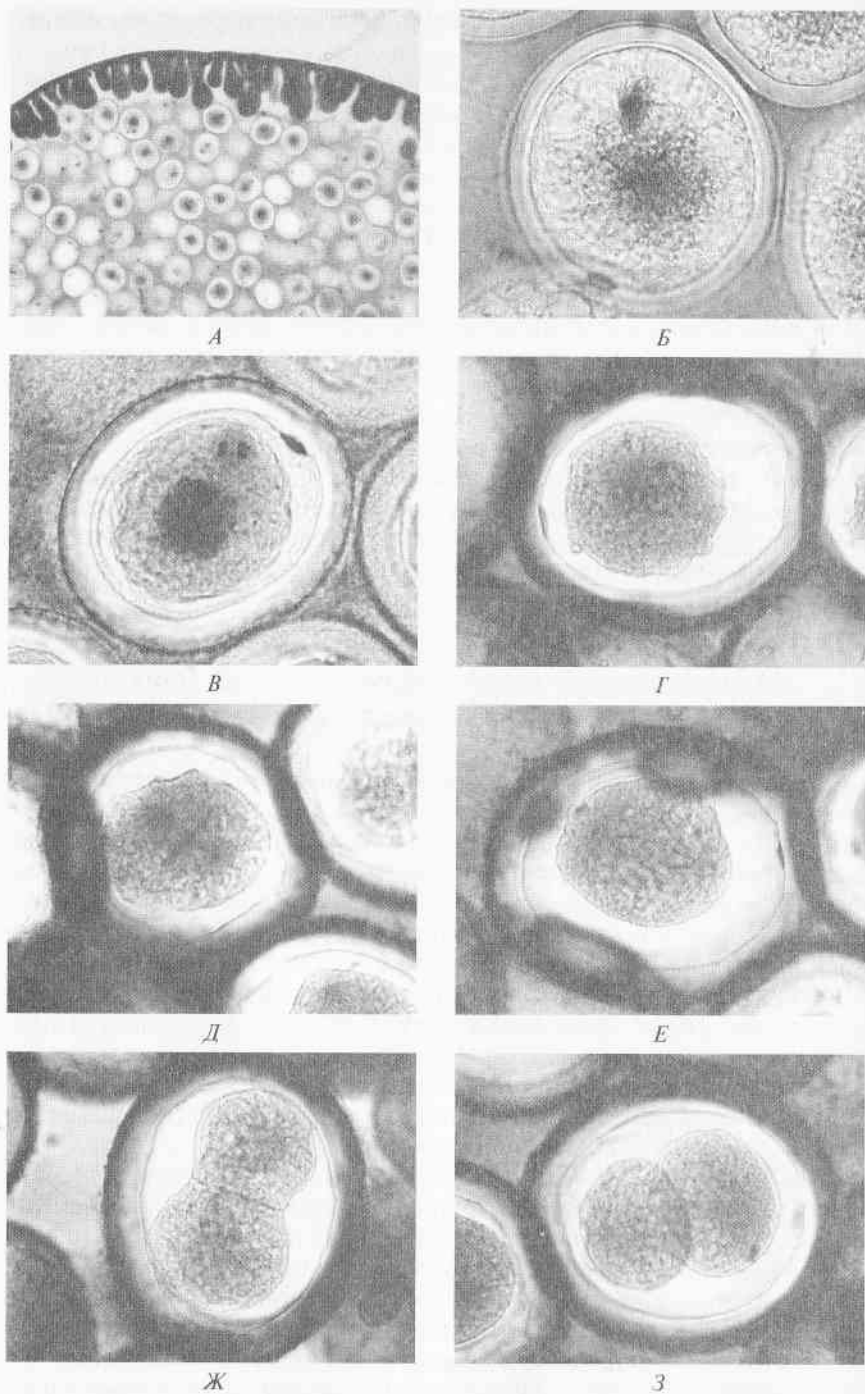


Рис. 22. Последовательность событий при оплодотворении у аскариды: А — поперечный срез матки аскариды при малом увеличении (объектив $\times 8$); Б — перстено первого деления созревания; В — веретено второго деления созревания; Г — стадия пронуклеусов; Д—Ж — метафаза, анафаза и телофаза первого деления дробления; З — стадия двух бластомеров

вого-редукционного тельца говорит о том, что первое деление мейоза у аскариды заканчивается еще до отхождения оболочки оплодотворения.

Кроме того, на препарате различима тонкая, но темная оболочка, в виде темного ободка покрывающая оболочку оплодотворения снаружи. Она называется кутикулой. Это третичная по своему происхождению оболочка, т.е. она формируется после оплодотворения, а материал, ее составляющий, секретруется клетками матки. На более поздних этапах оплодотворения кутикулярная оболочка становится более толстой и прочной. Ее функция — защищать эмбрион аскариды от воздействия внешней среды до тех пор, пока не произойдет вылупления личинок.

Препарат № 3. Матка аскариды (поперечный срез): стадия пронуклеусов и первого деления дробления

Задание. Последующие этапы процесса оплодотворения (стадию пронуклеусов; метафазу, анафазу и телофазу первого деления дробления; стадию двух бластомеров), как правило, можно увидеть на одном поперечном срезе матки аскариды. Иногда на одном препарате не хватает либо стадии пронуклеусов, либо стадии двух бластомеров. Для того чтобы зарисовать все стадии, надо просмотреть два и более препаратов.

Рекомендуем для студенческого практикума отобрать только те препараты, на которых присутствуют все перечисленные выше стадии.

Стадии, которые необходимо зарисовать, представлены на следующих рисунках:

- 1) 22, Г — стадия пронуклеусов;
- 2) 22, Д — метафаза первого деления дробления;
- 3) 22, Е — анафаза первого деления дробления;
- 4) 22, Ж — телофаза первого деления дробления;
- 5) 22, З — стадия двух бластомеров.

Стадия пронуклеусов. После завершения второго редукционного деления гаплоидные родительские геномы одеваются ядерными оболочками — формируются мужской и женский пронуклеусы, которые начинают сближаться, двигаясь по цитоплазме зиготы.

ты по сложной траектории. На большом увеличении в центре яйцеклетки хорошо видны два пронуклеуса, которые выглядят как два клеточных ядра. Из-за этого в старых учебниках зиготу на стадии пронуклеусов часто называли термином «синкарион». Часто внутри пронуклеусов виден ядерный материал. Он находится в спирализованном состоянии — это идет конденсация хромосом перед первым делением дробления. У некоторых зигот можно видеть остатки двух редуцированных телец, причем первое лежит на внутренней стороне оболочки оплодотворения, а второе — на плазматической мембране зиготы. На этой стадии отчетливо видна оболочка оплодотворения, покрытая толстой кутикулой.

Метафаза первого деления дробления аскариды. На срезе матки аскариды лучше всего выбрать срез, который прошел через оба полюса веретена первого деления дробления. В метафазе митотический аппарат деления уже четко виден. Он состоит из веретена и лучистого сияния, которые образованы микротрубочками,ходящими от центриолей. Хромосомы располагаются по экватору веретена. Каждая хромосома состоит из двух хроматид (сестринских хромосом), образование которых произошло путем редупликации в синтетическом периоде интерфазы. У лошадиной аскариды четыре хромосомы.

Сперматозоид вносит в яйцеклетку свое ядро, центросому, митохондрии. Центросома делится, между центриолями образуется веретено, вокруг которого появляется лучистая сфера. Оболочки обоих пронуклеусов при соприкосновении растворяются и хромосомы объединяются в единую группу. Так как каждое ядро привносит по гаплоидному набору хромосом, после объединения восстанавливается диплоидное число хромосом, свойственное всем соматическим и незрелым половым клеткам.

Анафаза и телофаза первого деления дробления аскариды. Митотическое деление яйцеклеток аскариды в принципе не отличается от митоза в других клетках животных. Однако у аскариды очень хорошо видны веретено деления, центриоли и сияние вокруг центриолей, поэтому, рассматривая этот препарат, особое внимание надо уделить стадиям телофазы. На этих стадиях митотический аппарат деления выражен наиболее четко. В анафазе сестринские хроматиды расходятся к противоположным полюсам клетки. В конце анафазы по периферии клетки (в ее центральной части) появляется борозда, которая постепенно углубляется и в телофазе делит тело клетки на две части. Одновременно в телофазе идет реконструкция дочерних ядер. При этом хромосомы деконденсируются, образуются ядрышко и ядерная оболочка.

Стадия образования двух бластомеров. Среди зигот на стадиях анафазы и телофазы первого деления дробления располагаются отдельные эмбрионы на стадии двух бластомеров, уже завершившие первое деление. Эту стадию нужно уметь отличать от поздней

телофазы. На двуклеточной стадии бластомеры полностью отделены друг от друга и часто лежат в разных оптических плоскостях, а на стадии телофазы обычно хорошо видны борозда дробления и контрактильное кольцо.

Дополнительное задание. Наблюдение за реакцией активации ооцитов выюна. Наблюдение за событиями, происходящими при оплодотворении ооцитов выюна (на модели активации неоплодотворенных ооцитов при попадании в водную среду). Подробное описание этого задания приведено в разделе «Рыбы: работа с живым материалом (развитие эмбрионов выюна)».

ДРОБЛЕНИЕ

После оплодотворения начинается следующий этап в индивидуальном развитии животных — процесс *дробления*. Дробление — это многократные митотические деления зиготы, в результате которых зародыш становится многоклеточным. Сначала зигота разделяется на две половины, затем на четыре части, восемь частей и т. д.

Дочерние клетки, образующиеся в период дробления, называются *бластомерами* (от *blastos* — зародыш, *meros* — часть), а разделяющие их плоскости — *бороздами дробления*.

Борозды, проходящие через анимальный и вегетативный полюсы зиготы, называются *меридиональными*. Борозда, проходящая перпендикулярно полярной оси зиготы через ее середину, называется *экваториальной*; борозды, параллельные экваториальной, называются *широтными*; борозды, проходящие параллельно поверхности зародыша, называются *тангенциальными*.

Деления дробления имеют некоторые отличия от обычных митотических делений.

Во-первых, разделившиеся клетки зародыша не растут, так что суммарный объем и масса всех возникших клеток не превышают объема и массы зиготы сразу после оплодотворения (отсюда и термин — «дробление»).

Во-вторых, количество ДНК в ядрах удваивается после каждого деления, как при обычном митозе, что приводит к увеличению количества ДНК на зародыш.

Такие особенности делений дробления приводят к тому, что восстанавливаются типичные для соматических клеток ядерно-цитоплазматические отношения. Их величина резко уменьшается в ходе большого роста ооцита.

Так, у веслоногих раков ядерно-цитоплазматическое отношение ооцита до начала роста составляет $\frac{1}{15}$, а к концу большого роста $\frac{1}{1260}$. Для ооцитов морского ежа эти величины составляют соответственно $\frac{1}{6}$ и $\frac{1}{550}$.

Таким образом, первая биологическая функция дробления — образование многоклеточности, а вторая — восстановление примерно тех же ядерно-цитоплазматических отношений, которые существовали у животного этого вида до периода большого роста ооцитов.

Особенности клеточных циклов при дроблении

Первые деления дробления зигот у большинства изученных животных проходят синхронно, так что число бластомеров составляет 2^n , где n — число делений дробления. Продолжительность синхронного периода дробления имеет видовые различия. У моллюсков синхронны первые 3—4 деления, у разных видов насекомых — 5—12 делений, у иглокожих — 6—8 делений, у костистых рыб — 4—11 делений, у осетровых рыб — 8—9 делений, у амфибий — 11—14 делений, у птиц — 5 делений. У круглых червей, млекопитающих и некоторых других животных периода синхронных делений нет, уже первые два бластомера делятся несинхронно.

Одна из отличительных особенностей клеточных циклов в раннем развитии животных — большая частота клеточных делений. Высокая пролиферативная активность, обусловленная прежде всего укороченными клеточными циклами, характерна как для первичноротых (полихеты, моллюски, насекомые), так и для вторичноротых (иглокожие, рыбы, амфибии, птицы). Укороченные клеточные циклы в период синхронных делений дробления отличаются отсутствием пресинтетической фазы G_1 . Фаза синтеза ДНК (S -фаза) занимает непродолжительный отрезок времени, удельная же доля митоза составляет, как правило, около 50 % генерационного времени, достигая в отдельных случаях 70—75 %. Главные синтетические процессы в синхронно делящихся бластомерах — синтез ДНК и гистонов.

Укорочение клеточных циклов при дроблении происходит потому, что в G_1 -фазе дробящихся эмбрионов полностью отсутствует экспрессия генов, т. е. геном зародыша полностью неактивен. Все синтетические процессы, в том числе и синтез гистоновых белков, идут за счет материнских матричных РНК, накопленных еще в оогенезе. Исключение из этого правила составляют животные с асинхронным дроблением. Так, у млекопитающих некоторые гены эмбриона начинают экспрессироваться на стадии двух бластомеров.

Считается, что потеря синхронности дробления связана именно с активацией генома зародыша. В развитии всех животных наступает момент, начиная с которого темпы клеточной репродукции замедляются и происходит десинхронизация делений дробления. Преобразование структуры клеточного цикла складывается из нескольких составляющих:

- резкое увеличение длительности фазы синтеза ДНК;
- увеличение продолжительности постсинтетической фазы G_2 ;
- возникновение и рост пресинтетической фазы G_1 .

Так, у морского ежа в период от стадии дробления до стадии гастролы генерационное время увеличивается в 20 раз, в основном за счет увеличения длительности S -фазы. Сходная картина

описана у шпорцевой лягушки, аксолотля, костистых рыб, полихет, моллюсков, насекомых и др.

Изменение структуры клеточного цикла сопровождается увеличением подвижности blastomeres во время удлинившейся интерфазы и началом транскрипции собственных генов зародыша. Это явление называется *переходом к средней бластуле* (среднебластульный переход). Процесс этот контролируется ядерно-цитоплазматическим отношением, которое постепенно увеличивается при дроблении.

Пространственная организация дробления

Характер дробления не одинаков у животных различных типов. Особенности пространственной организации дробления определяются следующими типами процессов:

- 1) закономерным расположением интерфазных ядер в blastomeres;
- 2) закономерной ориентацией митотических веретен делений дробления;
- 3) движениями blastomeres на различных фазах клеточного цикла.

На расположение ядер и веретен влияют количество и расположение желтка в цитоплазме яйцеклеток. Желток, будучи необходимым питательным резервом для развития зародыша, в то же время является пассивным балластом, задерживающим деление зиготы и blastomeres. Чем больше в цитоплазме желточных включений, тем медленнее делится эта часть цитоплазмы. При определенной степени перегрузки цитоплазмы желтком деление становится невозможным.

Правила зависимости между расположением желтка и положением ядер и веретен были сформулированы немецким ученым О. Гертвигом на основе правил, предложенных ранее ботаником Ю. Саксом для растительных меристем. Эти правила состоят в следующем: 1) клеточное ядро стремится расположиться в центре свободной от желтка цитоплазмы; 2) веретено клеточного деления стремится расположиться по направлению наибольшего протяжения свободной от желтка цитоплазмы.

Яйцеклетки с небольшим и средним количеством желтка (олиголецитальные и мезолецитальные) претерпевают полное (или *голобластическое*) дробление (от *holos* — целый, *blastos* — зародыш). Голобластический тип дробления характеризуется тем, что все содержимое зиготы входит в состав blastomeres, а зародыш развивается за счет внутриклеточной утилизации желтка. Полное дробление может быть *полным равномерным* (олиголецитальные яйцеклетки) и *полным неравномерным* (мезолецитальные яйцеклетки).

Наиболее общей закономерностью голобластического дробления является взаимная перпендикулярность (ортогональность) первых трех борозд дробления.

Яйцеклетки с большим количеством желтка (полилецитальные) претерпевают неполное, или меробластическое, дробление (от *meros* — часть). Меробластический тип дробления характеризуется тем, что лишь из части такой яйцеклетки формируется зародыш, а остальная часть представляет расходуемый питательный материал. Неполное дробление может быть *дискоидальным* (телолецитальные яйцеклетки с большим количеством желтка) и *поверхностным* (центролецитальные яйцеклетки).

Характер дробления зависит не только от количества и расположения желтка, но и от ряда других факторов, в частности от характерных для каждого типа животных особенностей цитоплазмы, формы яйцеклетки и т.д. Так, дробление может быть радиальным, спиральным, билатерально-симметричным, анархичным и т.д. На рис. 23 приведена классификация типов дробления и

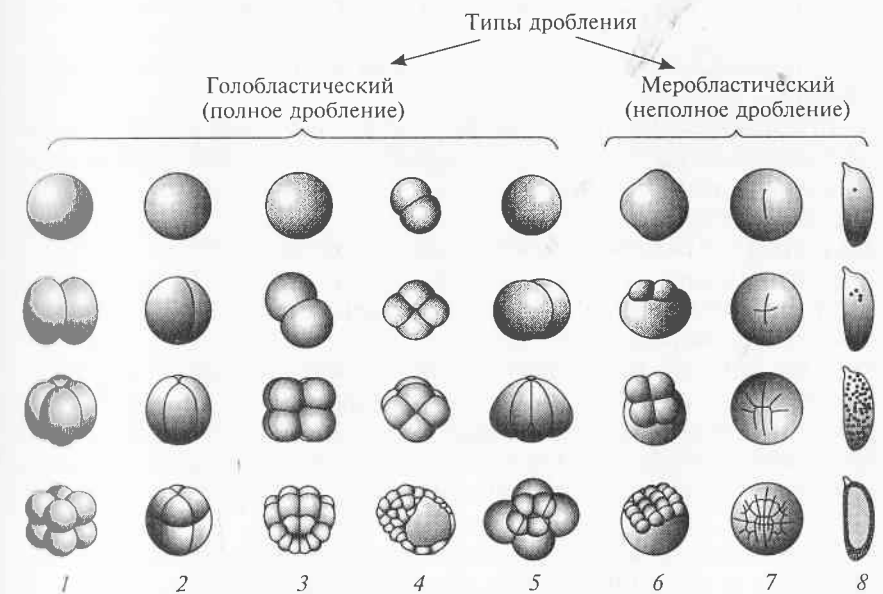


Рис. 23. Классификация типов дробления:

1 — полное равномерное дробление (иглокожие, бесчерепные); 2 — полное неравномерное дробление (амфибии, осетровые рыбы); 3 — полное билатеральное дробление (асцидии); 4 — полное равномерное ротационное дробление (плацентарные млекопитающие); 5 — полное спиральное дробление (большинство моллюсков; кольчатые, плоские и круглые черви); 6, 7 — неполное дискоидальное дробление (6 — костистые рыбы; 7 — рептилии, птицы); 8 — неполное поверхностное дробление (насекомые)

типов развития в зависимости от количества и распределения желтка в яйцеклетках.

У многих яйцеклеток на ранних стадиях дробления внутренние поверхности blastomeres расходятся, между ними возникает небольшая полость, которая увеличивается по мере дробления, в ней начинает накапливаться жидкость — продукт жизнедеятельности клеток. Эта полость называется *бластоцелью* (*blastos* — зародыш, *koilon* — полость). К концу дробления бластоцель у зародышей некоторых видов животных может достигать значительных размеров. Зародыш в конце процесса дробления называется *бластулой*.

Бластоцель, первый отсек внутренней среды организма, отличается по своему ионному составу от окружающей среды. Изоляция бластоцели от наружной среды обеспечивается формированием на боковых поверхностях соседних blastomeres специализированных межклеточных контактов (плотных контактов), непроницаемых для ионов. Транспорт ионов из внешней среды в бластоцель и обратно происходит через клетки стенки бластоцели и контролируется особенностями строения их плазматических мембран.

Строение бластулы зависит от типа дробления данной яйцеклетки, а тип дробления в значительной степени определяется количеством и расположением желтка. Рассмотрим основные типы дробления.

Полное равномерное дробление

Яйцеклетки с небольшим количеством желтка, равномерно распределенного по цитоплазме (олиголецитальные, гомолецитальные яйцеклетки), претерпевают полное равномерное радиально-симметричное дробление. В результате такого дробления развивается зародыш — *целобластула*. Так дробятся яйцеклетки животных, относящихся к типу иглокожих (в том числе морские ежи, морские звезды и офиуры) и подтипу бесчерепных (см. препарат № 1).

Целобластула характеризуется следующими признаками:

- 1) форма сферическая или приближающаяся к сферической;
- 2) однослойная стенка, состоящая из цилиндрических или кубических клеток;
- 3) большой сферический бластоцель занимает центральное положение.

В зиготах морского ежа борозда первого деления дробления проходит меридионально, борозда второго деления — перпендикулярно первой и также меридионально, борозда третьего деления дробления — экваториально, отделяя четыре blastomeres анималь-

ного полюса от четырех blastomeres вегетативного полюса (это называют ортогональностью борозд первых трех делений дробления) (рис. 24, А—Г). Четвертое деление в разных ярусах blastomeres происходит по-разному. В анимальном ярусе веретена деления располагаются широтно, так что blastomeres разделяются меридионально на восемь клеток одинаковой величины. Эти blastomeres называются *мезомерами*. В вегетативном ярусе blastomeres веретена деления располагаются меридионально и смещены к веге-

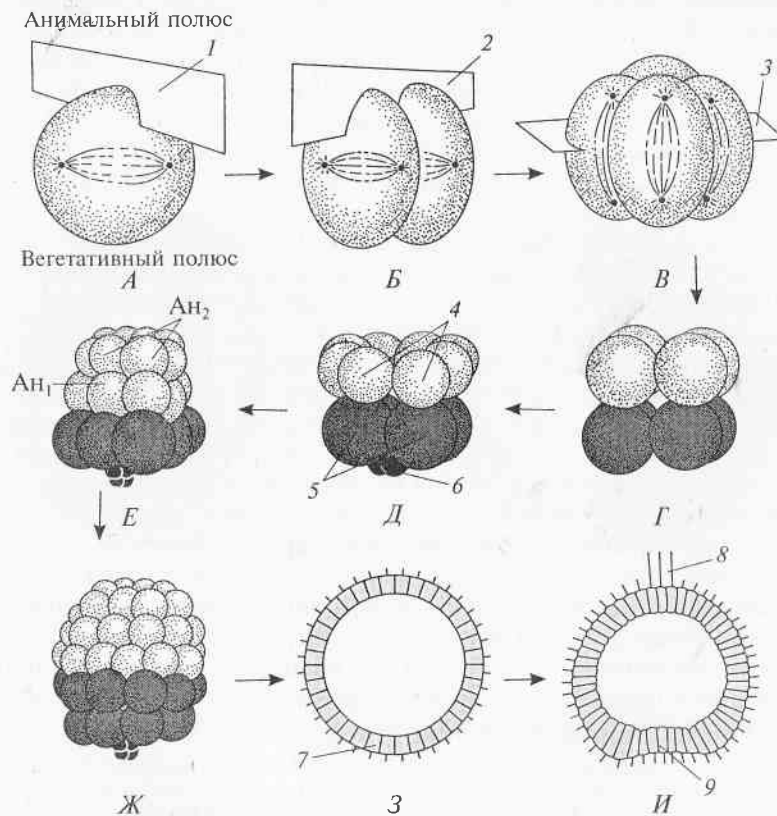


Рис. 24. Дробление у морского ежа и образование целобластулы:

А — борозда первого деления дробления; Б — борозда второго деления дробления; В — борозда третьего деления дробления; Г — стадия 4 blastomeres; Д — стадия 8 blastomeres; Е — стадия 16 blastomeres; Ж — стадия ранней бластулы; 3 — стадия средней бластулы; И — стадия поздней бластулы (свободноплавающая целобластула); 1 — меридиональная плоскость первого деления дробления; 2 — меридиональная плоскость второго деления дробления; 3 — экваториальная плоскость третьего деления дробления; 4 — мезомеры; 5 — макромеры; 6 — микромеры; 7 — эпителиальные клетки целобластулы с ресничками; 8 — пучок ресничек на анимальном полюсе поздней бластулы; 9 — вегетативная пластинка поздней бластулы

тивному полюсу, так что борозды проходят широтно. В результате такого деления образуются четыре крупные клетки — *макромеры*, а на вегетативном полюсе — четыре мелких клетки, или *микроммеры* (рис. 24, Д). При пятом делении восемь мезомеров делятся широтно и образуют два «анимальных» яруса — $Ан_1$ и $Ан_2$, которые располагаются один над другим (рис. 24, Е). Макромеры делятся меридионально и образуют восьмиклеточный ярус ниже $Ан_1$. Микроммеры также делятся и примыкают к более крупным макромерам. Борозды шестого деления во всех бластомерах располагаются широтно, борозды седьмого деления — меридионально. В результате седьмого деления дробления возникает 128-клеточный зародыш — бластула (рис. 24, Ж). Ранняя бластула морского ежа представляет собой полый шар, стенка которого составлена одним слоем клеток округлой формы (рис. 24, З). После 8-го деления клеточный цикл удлиняется и начинается десинхронизация делений дробления.

В ходе развития поверхность клеточного пласта бластулы увеличивается, стенка утончается, при этом длинная ось клеток располагается перпендикулярно поверхности стенки бластулы. Наружные участки боковых поверхностей соседних бластомеров соединены плотными контактами. На наружной поверхности бластомеров образуются реснички, что позволяет зародышу вращаться внутри оболочки оплодотворения. Поздняя бластула имеет пучок ресничек на анимальном полюсе (*апикальный орган*) и более уплощенный слой бластомеров на вегетативном полюсе, который называется *вегетативной пластинкой* (рис. 24, И). На этой стадии клетки начинают секретировать фермент вылупления, который растворяет оболочку оплодотворения, зародыш выходит из оболочки и становится ранней личинкой — свободноплавающей бластулой. Такая личинка держится в толще морской воды за счет биения ресничек, а от воздействия внешней среды ее защищает гиалиновая оболочка, образовавшаяся еще при оплодотворении, которая плотно прилегает к внешней поверхности клеток.

Полное неравномерное дробление

Яйцеклетки со средним количеством желтка, который неравномерно распределен вдоль анимально-вегетативной оси яйца (мезолецитальные, телолецитальные яйцеклетки), претерпевают полное неравномерное, радиально-симметричное дробление. Так дробятся яйцеклетки амфибий и осетровых рыб. В результате такого дробления возникает зародыш — *амфибластула* (препарат № 2).

Амфибластула характеризуется следующими признаками:

- 1) форма сферическая;
- 2) стенка состоит из нескольких слоев клеток;

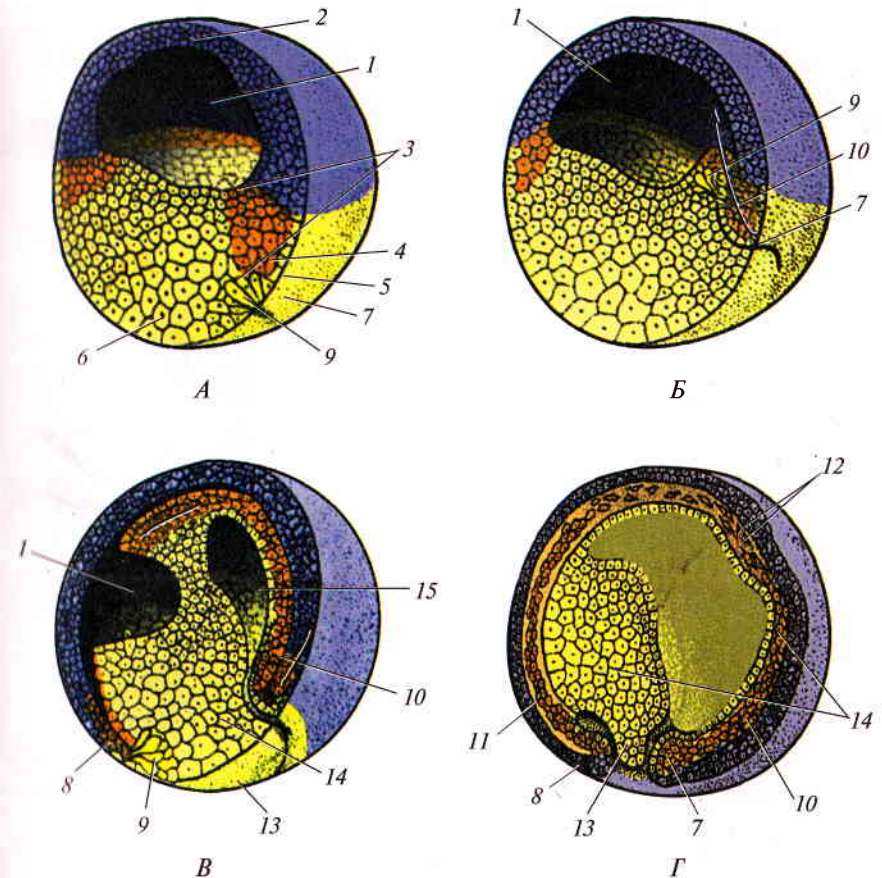
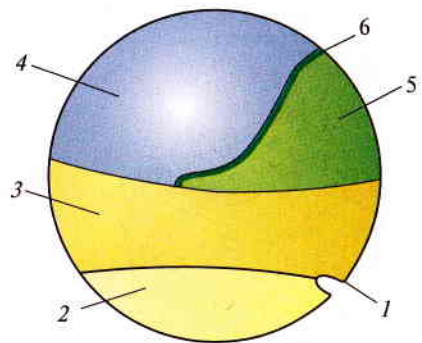
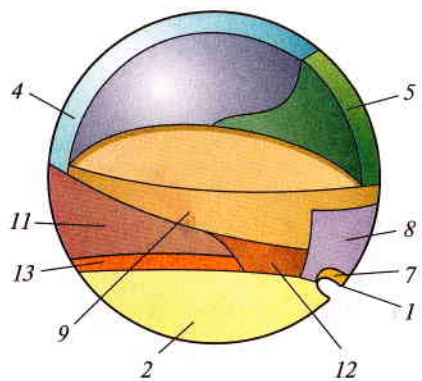


Рис. 1. Движения клеток при гастрляции амфибий.

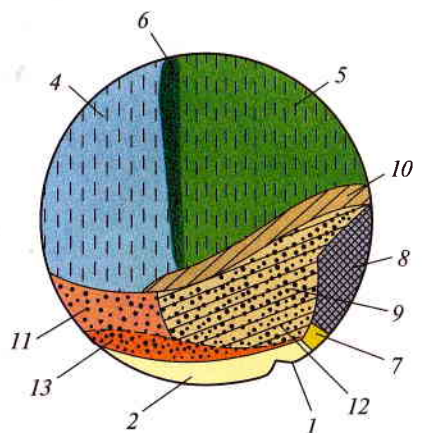
Показаны центральные сагиттальные срезы зародышей, у которых анимальный полюс сверху, вегетативный — внизу, дорсальная сторона — справа: А — стадия инициации гастрляционных движений. Показаны колбовидные клетки, которые погружаются внутрь и формируют дорсальную губу бластопора; В — ранняя гастрюла. Колбовидные клетки направляются вдоль внутренней стенки бластоцеля, увлекая за собой подворачивающиеся клетки дорсальной зоны (направление движения указано стрелками). Образуются боковые губы бластопора; В — средняя гастрюла. Образуется ventральная губа, бластопор замыкается в кольцо. Архентерон увеличивается в размерах. Мезодерма продолжает подворачиваться через губы бластоцеля и мигрировать к анимальному полюсу (показано стрелкой); Г — поздняя гастрюла. Диаметр бластопора сокращается, желточная пробка погружается внутрь. Эктодерма, мезодерма и энтодерма заняли свое окончательное положение; 1 — бластоцель; 2 — крыша бластоцеля; 3 — краевая зона; 4 — глубокие клетки; 5 — поверхностный слой; 6 — вегетативная желточная масса; 7 — дорсальная губа бластопора; 8 — ventральная губа бластопора; 9 — колбовидные клетки; 10 — дорсальная мезодерма; 11 — ventральная мезодерма; 12 — мезенхима головы; 13 — желточная пробка; 14 — энтодерма; 15 — архентерон



A



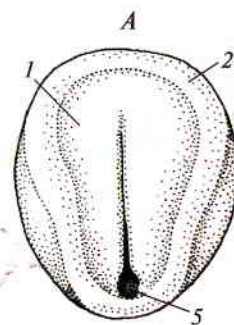
B



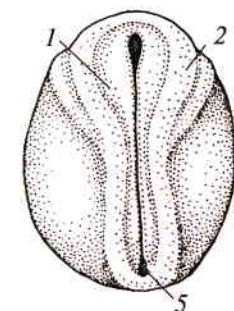
B

Рис. II. Карта презумптивных зачатков на стадии бластулы у бесхвостых (A и B) и хвостатых (B) амфибий.

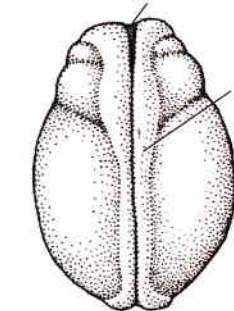
У бесхвостых амфибий презумптивные мезодермальные зачатки располагаются под поверхностным слоем клеток (A — поверхность, B — внутренние слои); у хвостатых амфибий они выходят на поверхность зародыша (B); 1 — дорсальная губа бластопора; 2 — энтодерма; 3 — энтодерма поверхностного слоя краевой зоны; 4 — покровная эктодерма; 5 — нервная пластинка; 6 — нервный гребень; 7 — прехордальная пластинка; 8 — хорда; 9 — мезодерма сомитов; 10 — мезодерма хвостовых сомитов; 11 — материал латеральной пластинки мезодермы; 12 — сердце и anteriorные кровяные островки; 13 — постериорные кровяные островки



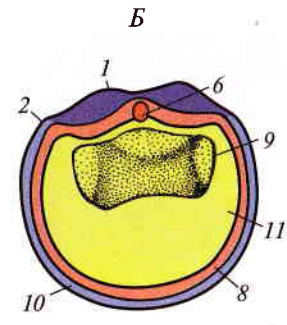
A



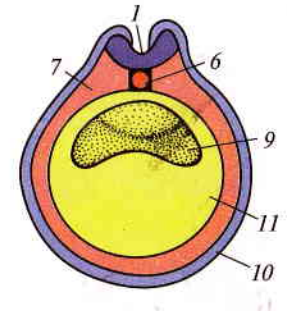
A



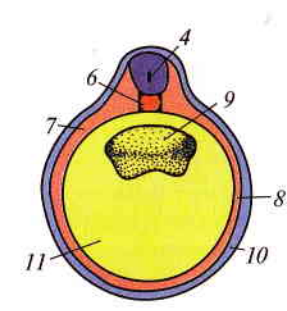
A



B



B



B

Рис. III. Процесс нейруляции (ранняя, средняя и поздняя нейрулы), как он виден с дорсальной поверхности зародыша (A) и на центральных поперечных срезах (B):

1 — нервная пластинка; 2 — нервный валик; 3 — невропор; 4 — нервная трубка; 5 — бластопор; 6 — хорда; 7 — мезодерма сомитов; 8 — латеральная пластинка мезодермы; 9 — вторичная кишка; 10 — эктодерма; 11 — энтодерма

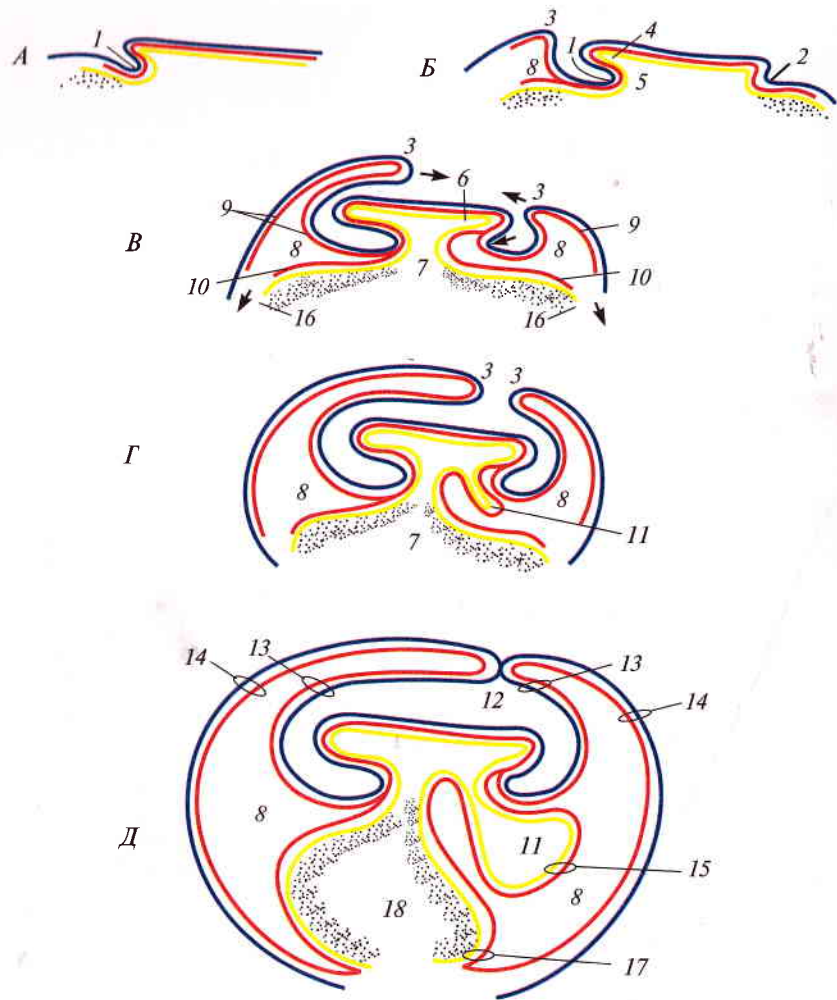


Рис. IV. Последовательные стадии образования внезародышевых органов куриного зародыша (сагиттальная проекция; эктодерма обозначена голубым цветом, мезодерма — красным, энтодерма — желтым; стрелки указывают направления образования складок):

А — начало формирования головного отдела туловищной складки; *Б* — начало образования передней амниотической складки; *В* — последующие стадии образования амниотических складок; *Г* — начало образования аллантаиса; *Д* — структура внезародышевых органов; 1 — головная складка; 2 — хвостовая складка; 3 — амниотические складки; 4 — головная кишка; 5 — передние кишечные ворота; 6 — задняя кишка; 7 — желточный стебелек; 8 — экзоцелом; 9, 10 — соответственно париетальный и висцеральный внезародышевые листки латеральной мезодермы; 11 — вырост задней кишки (аллантаис); 12 — амниотическая полость; 13 — стенка амниона; 14 — сероза; 15 — стенка аллантаиса; 16 — край обростания; 17 — стенка желточного мешка; 18 — желточный мешок

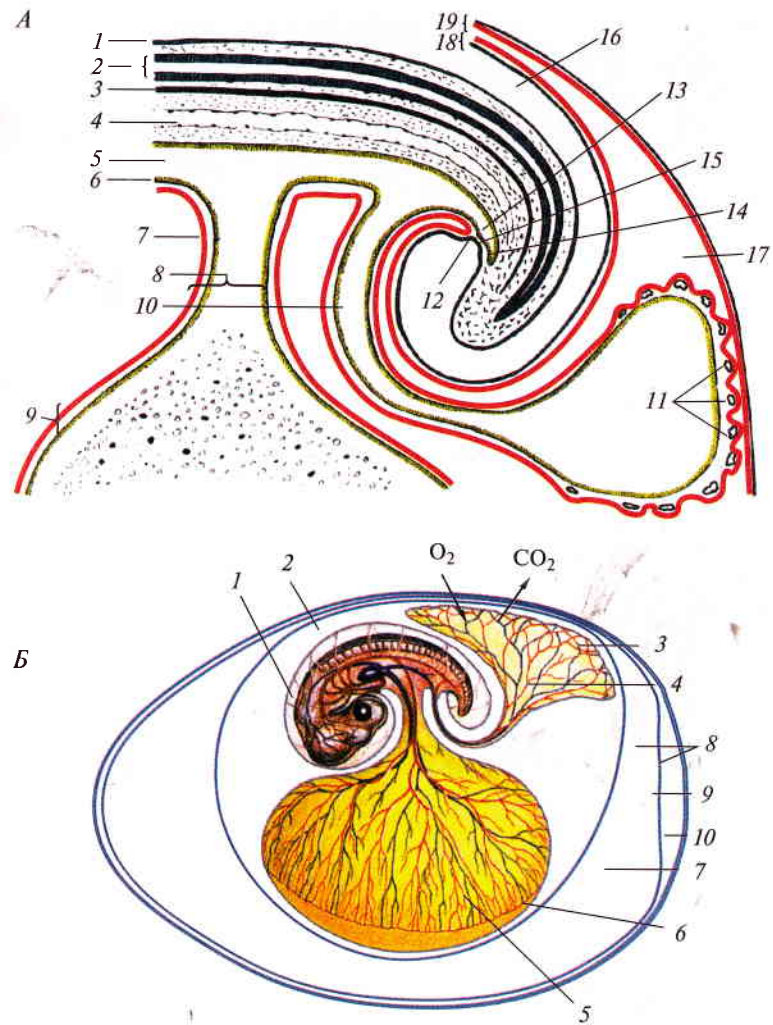


Рис. V. Система кровообращения зародыша курицы:

А — формирование хориона (схема каудальной части зародыша, сагиттальная проекция); 1 — эктодерма; 2 — нервная трубка; 3 — хорда; 4 — дорсальная аорта; 5 — кишка зародыша; 6 — энтодерма; 7 — мезодерма; 8 — желточный стебелек; 9 — стенка желточного мешка (висцеральная мезодерма и энтодерма); 10 — ножка аллантаиса; 11 — сосуды аллантаиса (висцеральная мезодерма); 12 — проктодеум; 13 — клоака; 14 — постанальная кишка; 15 — клоакальная мембрана; 16 — амниотическая полость; 17 — экзоцелом (внезародышевый целом); 18 — стенка амниона (париетальная мезодерма и внезародышевая эктодерма); 19 — стенка серозы (внезародышевая эктодерма и париетальная мезодерма); *Б* — формирование сосудов зародышевой и внезародышевой областей: 1 — тело зародыша; 2 — стенка амниона; 3 — хорион (сероза + аллантаис); 4 — аллантаис; 5 — желточный мешок; 6 — сероза; 7 — белок яйца; 8 — подскорлуповые оболочки; 9 — воздушная камера; 10 — скорлупа

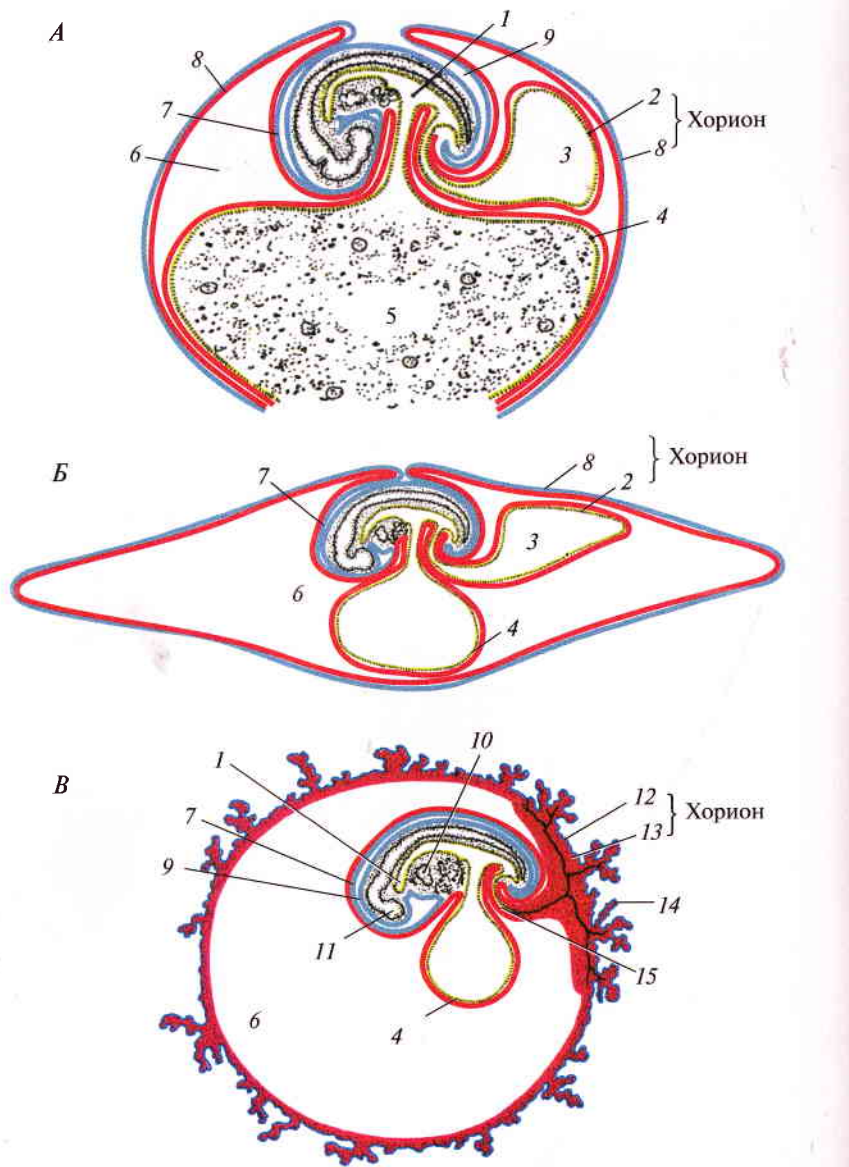


Рис. VI. Формирование внезародышевых органов у зародыша курицы (А), свиньи (Б) и человека (В) (сагиттальная проекция):

1 — кишка зародыша; 2 — аллантоис; 3 — полость желточного мешка; 4 — стенка желточного мешка; 5 — желток; 6 — внезародышевый целом; 7 — амнион; 8 — сероза; 9 — амниотическая полость; 10 — сердце зародыша; 11 — головной мозг зародыша; 12 — слой трофобласта (цитотрофобласт и синцитиотрофобласт); 13 — мезодерма и кровеносные сосуды аллантоиса; 14 — ворсинка хориона; 15 — ножка аллантоиса. Эктодерма обозначена голубым цветом, мезодерма — красным, энтодерма — желтым

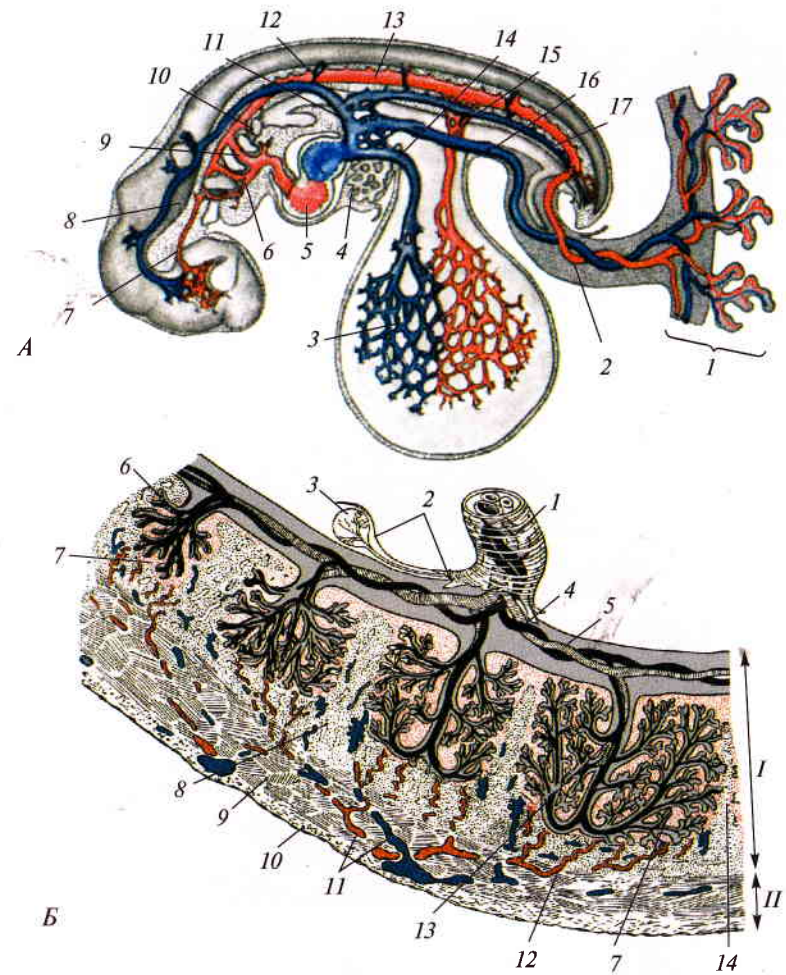


Рис. VII. Кровеносная система эмбриона человека (по Б.Петтену, 1959):

А — схематическое изображение сосудов и внезародышевых органов плода человека к концу 1-го месяца беременности. При изображении парных сосудов указаны только ближние к наблюдателю (1 — хорион (плодная часть плаценты); 2 — пупочная артерия; 3 — желточное сосудистое сплетение; 4 — печень; 5 — сердце; 6 — корень вентральной аорты; 7 — внутренняя сонная артерия; 8 — передняя кардинальная вена; 9 — третья дуга аорты; 10 — четвертый глоточный карман; 11 — общая сонная вена; 12 — межсегментарная вена; 13 — дорсальная аорта; 14 — желточнобрыжеечная вена; 15 — желточнобрыжеечная артерия; 16 — пупочная вена; 17 — задняя кардинальная вена); Б — сосуды матери и плода в плаценте человека (I — плодная часть плаценты; II — материнская часть плаценты; 1 — пуповина; 2 — край амниона (остальная часть отрезана); 3 — желточный мешок; 4 — ветвь пупочной вены; 5 — ветвь пупочной артерии; 6 — ворсинки хориона; 7 — материнская кровь, омывающая ворсинки хориона; 8 — маточный эндометрий; 9 — миометрий; 10 — серозная оболочка матки; 11 — вены и артерии миометрия; 12 — спиральные вены и артерии эндометрия (переходят в синусы, открывающиеся в полости вокруг ворсинок); 13 — основной ствол ворсины хориона; 14 — септа)

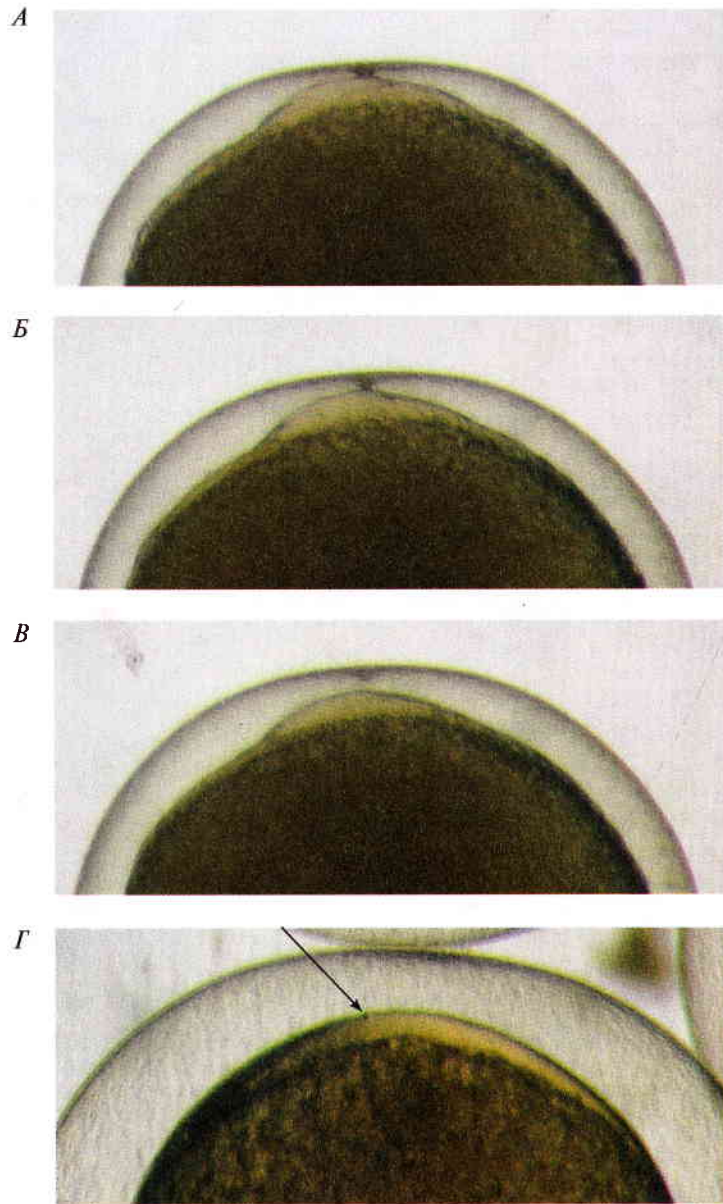


Рис. VIII. Завершение мейоза в активированных яйцеклетках выюна:

А — контакт воронки микропиле и воспринимающего бугорка (4–5 мин от момента активации); *Б* — начало расхождения воронки микропиле и воспринимающего бугорка (5–6 мин от момента активации); *Б'* — расхождение воронки микропиле и воспринимающего бугорка (6–7 мин от момента активации); *Б''* — образование второго полярного тельца (показано стрелкой)

- 3) бластоцель смещен к анимальному полюсу;
- 4) анимальная часть стенки бластулы (крыша бластоцели) тоньше, чем массивная вегетативная часть стенки (дно бластоцели);
- 5) анимальные бластомеры пигментированы, содержат меньшее количество желтка, чем крупные вегетативные бластомеры, и мельче их.

Для мезолецитальных яйцеклеток ортогональность борозд первых трех делений дробления выводится непосредственно из правил Гертвига — Сакса. Веретено первого деления дробления в зиготе амфибий располагается широтно под поверхностью анимального полюса. Соответственно борозда первого деления дробления проходит меридионально (рис. 25, *А*). Желток, сосредоточенный в

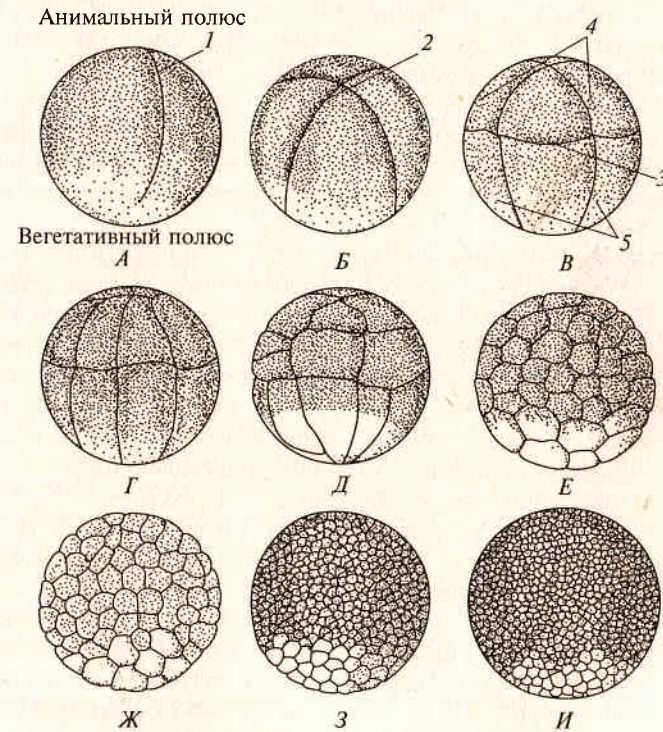


Рис. 25. Дробление яйца амфибий на примере травяной лягушки (*Rana temporaria* L.):

А — первое деление дробления; *Б* — второе деление дробления; *Б'* — стадия 8 бластомеров; *Г* — стадия 16 бластомеров; *Д* — стадия 32 бластомеров; *Е* — стадия 64 бластомеров; *Ж* — стадия ранней бластулы; *З* — стадия средней бластулы; *И* — стадия поздней эпителиальной бластулы; 1 — меридиональная борозда первого деления дробления; 2 — меридиональная борозда второго деления дробления; 3 — широтная борозда второго деления дробления; 4 — анимальные бластомеры; 5 — вегетативные бластомеры

вегетативном полушарии, затрудняет дробление. Борозда первого деления закладывается на анимальном полюсе и медленно распространяется на вегетативную область. Так, у аксолотля борозда дробления распространяется в анимальной области со скоростью около 1мм/мин.

Борозда второго деления начинает закладываться вблизи от анимального полюса еще до того, как борозда первого деления дробления разделила вегетативное полушарие. Веретена второго деления расположены в той же плоскости, что и веретено первого деления, но под прямым углом к нему, поскольку эти направления примерно соответствуют наибольшему протяжению свободной от желтка цитоплазмы. Борозда второго деления дробления проходит также меридионально (рис. 25, В).

Первые четыре blastomeres мезолецитальных яйцеклеток примерно равны между собой и обозначаются как квадранты яйца. Далее направление наибольшей протяженности свободной цитоплазмы в каждом квадранте совпадает с меридианами яйца, так как широтные поперечники короче меридиональных. Соответственно этому все четыре веретена третьего деления располагаются меридионально, но остаются смещенными к анимальному полюсу.

Борозды третьего деления дробления проходят широтно и смещены к анимальному полюсу. В результате образуются четыре *анимальных blastomeres* меньшего размера и четыре более крупных *вегетативных blastomeres* (рис. 25, В). Поскольку кортекс анимального полушария яйцеклеток амфибий и осетровых рыб содержит многочисленные меланосомы, анимальные blastomeres дробящихся зародышей имеют темную окраску. Клетки-потомки пигментированных анимальных blastomeres сохраняют окраску в течение всего раннего развития, вплоть до стадии нейрулы.

Позже дробление утрачивает общую правильность, и на последующих стадиях дробления анимальная область содержит многочисленные мелкие клетки, а в вегетативной области имеется относительно небольшое количество крупных, богатых желтком blastomeres. Зародыш амфибий на стадии от 16 до 64 клеток называют *морулой* по внешнему сходству с тутовой ягодой (*morus* — тутовое дерево) (рис. 25, Г—Е). На стадии 128 blastomeres (ранняя blastula — рис. 25, Ж) появляется хорошо различимый blastocoel. На стадии средней blastula (рис. 25, З) после 12-го деления дробления у зародышей шпорцевой лягушки *Xenopus laevis*, как и у других видов амфибий, наблюдается падение митотического индекса, активация генов зародыша и увеличение подвижности blastomeres. По мере развития поверхность наружных клеток blastula уплощается, они образуют эпителиальный слой. Зародыш перед гастрულიей называется поздней эпителиальной blastulой (рис. 25, И).

Сходным образом происходит дробление у осетровых рыб, однако синхронность дробления нарушается раньше, так как их яйцеклетки содержат чуть большее количество желтка.

Неполное дискоидальное дробление

Яйцеклетки с большим количеством желтка, который распределен неравномерно вдоль анимально-вегетативной оси яйца (полилецитальные, резко телолецитальные яйцеклетки), претерпевают неполное дискоидальное дробление. Так дробятся зиготы костистых рыб, рептилий и птиц. В результате такого дробления образуется зародыш — *дискобластула* (препарат № 4).

Дискобластула характеризуется следующими признаками:

- 1) форма сферическая;
- 2) крыша blastula имеет вид небольшого многоклеточного диска, называемого *blastodiskом*, или *blastoderмой*, а дно представлено объемной массой нераздробившегося желтка;
- 3) между blastodiskом и желтком имеется узкое пространство — *подзародышевая полость*.

Рассмотрим дробление костистых рыб. В яйцеклетках костистых рыб после оплодотворения начинается движение цитоплазмы по направлению к анимальному полюсу, где образуется скопление свободной от желтка цитоплазмы — будущий blastodisk. Масса недробящегося желтка называется *желточной клеткой*. По периферии blastodиска его цитоплазма непосредственно переходит в тонкий поверхностный слой цитоплазмы желточной клетки — *желточный цитоплазматический слой*. Такая сегрегация цитоплазмы от остального объема яйцеклетки, занятой желтком, продолжается в течение нескольких делений дробления.

Дискоидальное дробление у костистых рыб характеризуется тем, что его первые четыре-пять борозд проходят меридионально (вертикально) и под прямым углом друг к другу (рис. 26). Дискоидальное дробление, как и полное неравномерное дробление, полностью отвечает правилам Гертвига—Сакса.

Борозда первого деления дробления закладывается на анимальном полюсе и распространяется вертикально по направлению к вегетативному, но разделяет только цитоплазму blastodиска, так что образовавшиеся blastomeres снизу и по периферии blastodиска не отграничены от желтка. Борозда первого деления проходит поперек длинной оси blastodиска, который имеет эллипсоидную форму при взгляде со стороны анимального полюса (рис. 26 А, Б). Борозда второго деления дробления проходит перпендикулярно первой борозде вдоль длинной оси blastodиска (рис. 26, В). Борозды третьего деления параллельны борозде первого, а борозды четвертого деления параллельны бороздам второго (рис. 26, Г, Д).

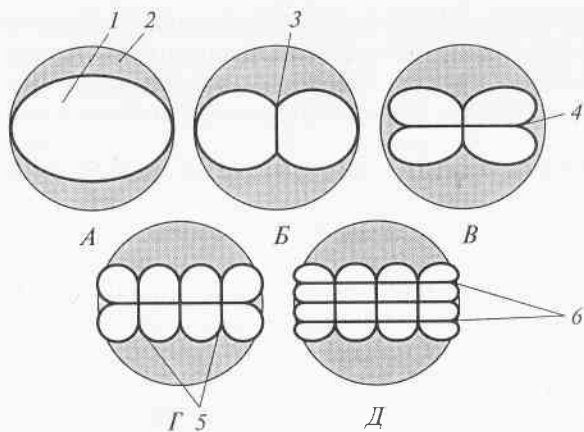


Рис. 26. Схема первых делений дробления костистых рыб (вид с анимального полюса):

А — зигота; Б — стадия 2 бластомеров; В — стадия 4 бластомеров; Г — стадия 8 бластомеров; Д — стадия 16 бластомеров; 1 — бластодиск; 2 — желточная клетка; 3 — борозда первого деления дробления; 4 — борозда второго деления дробления; 5 — борозды третьего деления дробления; 6 — борозды четвертого деления дробления

На стадии 16 бластомеров впервые появляются клетки, полностью отделенные друг от друга и от желтка, — это кварталет самых центральных бластомеров. Такое полное отделение происходит в конце четвертого цикла, когда борозды деления отсекают бластодиск от центра, распространяясь к краю бластодиска. Периферические 12 бластомеров называются *краевыми бластомерами*. Их цитоплазма переходит непосредственно в желточный цитоплазматический слой.

У аквариумной рыбки данио (*Brachydanio rerio*) борозды пятого деления дробления проходят параллельно бороздам первого и третьего делений. Обычно 32 бластомера лежат на желточной клетке в виде четырех рядов по 8 клеток (4×8), но встречаются зародыши с менее упорядоченной картиной расположения бластомеров.

Борозда шестого деления дробления проходит горизонтально (параллельно экватору яйца), в результате этого образуется второй, внутренний ярус бластомеров, называемых *глубокими клетками*. Из глубоких клеток образуется непосредственно зародыш костистых рыб. Каждая глубокая клетка является одной из двух дочерних клеток четырех центральных бластомеров на 32-клеточной стадии. Другие дочерние клетки остаются поверхностными. Дочерние клетки краевых бластомеров после шестого деления становятся поверхностными клетками зародыша. У других видов костистых рыб (вьюн *Misgurnus fossilis* L., медака *Oryzias latipes*) уже борозда пятого деления дробления проходит горизонтально.

В последующем появляются тангенциальные борозды, при этом направление борозд дробления подвержено большим индивидуальным колебаниям. Деления дробления становятся «метасинхронными», поскольку в ходе каждого клеточного цикла по бластодиску проходит волна митозов. Клетки на анимальном полюсе вступают в митоз первыми, краевые бластомеры последними. Зародыш на стадии 256 бластомеров представляет собой морулу, где бластомеры образуют бугристую шапочку, возвышающуюся над желтком.

У данио после 9-го деления клеточный цикл удлиняется, наступает десинхронизация делений и появляется подвижность глубоких бластомеров. У зародышей вьюна эти процессы наблюдаются после 11-го деления дробления.

Краевые бластомеры ранней бластулы имеют уникальную судьбу. Начиная с 10-го клеточного цикла, боковые мембраны этих клеток исчезают, а цитоплазма и ядра сливаются с желточным цитоплазматическим слоем желточной клетки. Так образуется *желточный синцитиальный слой* с одним рядом ядер в виде узкого кольца вокруг края бластодермы. После образования желточного синцитиального слоя клетки вышележащего яруса поверхностных бластомеров становятся краевыми, но в отличие от краевых бластомеров предыдущих стадий развития они полностью отделены мембранами от желточной клетки. Ядра желточного синцития претерпевают 3—5 метасинхронных делений, количество рядов ядер к стадии средней бластулы возрастает. К поздней бластуле часть ядер синцития перемещается под бластодерму, образуя *внутренний желточный синцитиальный слой*, другая часть желточного синцития спереди от края бластодермы формирует *наружный желточный синцитиальный слой*. Часть ядер внутреннего слоя может образовываться за счет деления самых базальных глубоких бластомеров. Желточный синцитиальный слой непосредственно не участвует в построении тела зародыша. Это экстраэмбриональное образование, имеющее важное морфогенетическое значение и обеспечивающее эпиболию бластодермы во время гастрюляции.

Поверхностные бластомеры в процессе бластуляции образуют эпителиальный монослой бластодермы — *покровный слой*. Вначале поверхностные бластомеры делятся как в плоскости пласта, так и перпендикулярно ему. Планарные деления дают дочерние клетки, остающиеся в покровном слое, а при перпендикулярном делении одна дочерняя клетка остается в покровном слое, другая же становится глубокой клеткой. По мере развития клетки покровного слоя сильно уплощаются, покровный слой становится трудно различимым. Боковые поверхности бластомеров покровного слоя образуют плотные и промежуточные контакты, которые обеспечивают изоляцию внутренней среды зародыша от окружающей среды. Краевые бластомеры покровного слоя и приле-

жащие к ним участки желточного синцитиального слоя соединены плотным и следующим за ним протяженным промежуточным контактом. К стадии поздней бластулы деления бластомеров покровного слоя совершаются только в плоскости пласта, а после начала эпителии и до ее конца число клеток покровного слоя не меняется. Клетки покровного слоя не участвуют в построении тела зародыша.

Таким образом, к стадии поздней бластулы в зародышах костистых рыб формируются три морфологически обособленных клеточных компартамента с разной судьбой — *глубокие клетки, покровный слой и желточный синцитиальный слой*. Трехслойная структура бластодермы — особенность, общая для всех костистых рыб.

Неполное поверхностное дробление

В яйцеклетках с большим количеством центрально расположенного желтка (полилецитальные, центролецитальные) дробление ограничено поверхностным слоем цитоплазмы. Так дробятся яйцеклетки насекомых. В результате такого дробления образуется зародыш, который называется *перибластулой* (препарат № 5).

Перибластула характеризуется следующими признаками: 1) форма эллипсоидная; полости не имеет; 2) бластодерма состоит из одного-двух слоев клеток, окружающих желток.

Особенность этого типа дробления состоит в том, что обособление клеток происходит только после многократного деления ядер. После слияния пронуклеусов ядро зиготы, окруженное свободной от желтка цитоплазмой, располагается в центре. Там оно претерпевает несколько митотических делений. У дрозофилы в результате таких делений продолжительность 8 мин каждое образуется 256 ядер (рис. 27, А—Г). Затем ядра с окружающими их островками цитоплазмы (*энергиды*) мигрируют на периферию яйца. Когда во время десятого митотического цикла ядра достигают периферии, каждое из них окружается микротрубочками и микрофиламентами. При этом ядра дробления располагаются и делятся в общем поверхностном слое цитоплазмы. Эта стадия называется стадией *синцитиальной бластодермы* (рис. 27, Д).

Ядра, мигрирующие к заднему полюсу яйца, вскоре окружаются плазматическими мембранами и образуют *полярные клетки* зародыша, дающие впоследствии начало половым клеткам взрослого организма (рис. 27, Е, Ж). После образования полярных клеток цитоплазматическая мембрана яйца образует впячивания (борозды дробления), которые распространяются между ядрами от поверхности к желтку. В результате каждое ядро обособляется в отдельной клетке. Возникает *клеточная бластодерма* (рис. 28). Ее клетки покрывают одним слоем богатую желтком сердцевину яйца.

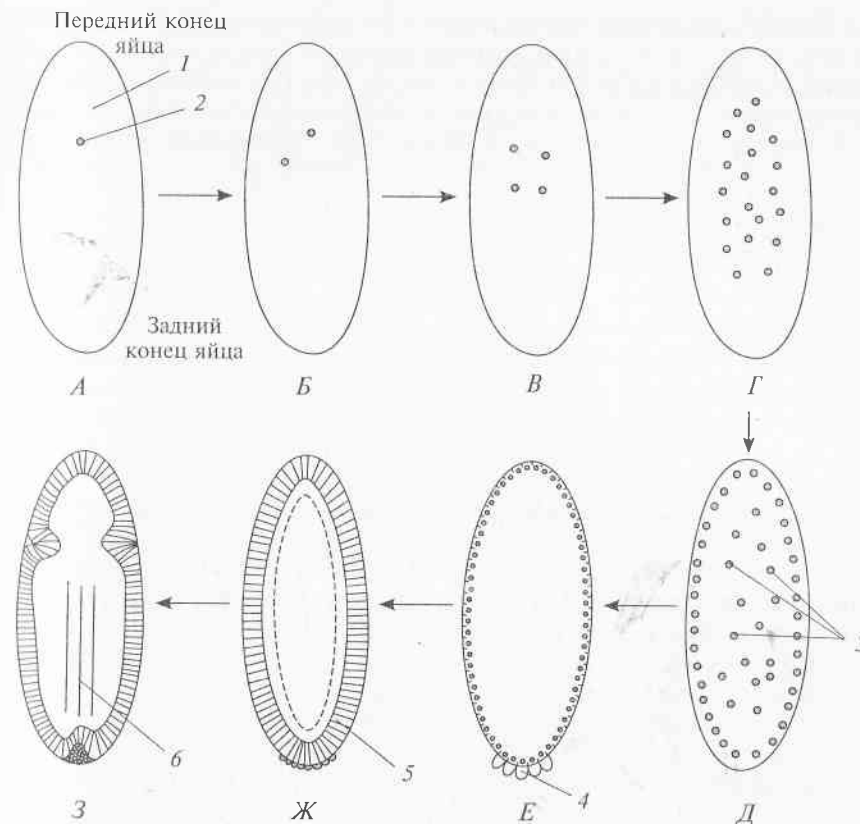


Рис. 27. Поверхностное дробление яйца дрозофилы и формирование перибластулы:

А — зигота; Б — стадия 2 ядер; В — стадия 4 ядер; Г — стадия 32 ядер; Д — стадия синцитиальной бластодермы; Е — формирование полярных клеток, начало обособления клеток бластодермы; Ж — стадия клеточной бластодермы; З — начало формирования зародышевой полоски; 1 — желток; 2 — ядро; 3 — энергиды; 4 — полярные клетки; 5 — клеточная бластодерма (перидерма); 6 — зародышевая полоска

У дрозофилы этот слой состоит приблизительно из 6000 клеток и формируется через 3 ч после оплодотворения. У зародышей насекомых часть дочерних ядер остается в желтке и становится *вителлофагами*, участвующими в утилизации желтка.

Процесс обособления клеток у зародышей насекомых сопровождается увеличением продолжительности клеточных циклов и десинхронизацией делений дробления. В это же время отмечается усиление транскрипции.

Распределение клеток в бластодерме не равномерное и не случайное: клетки концентрируются на вентральной поверхности,

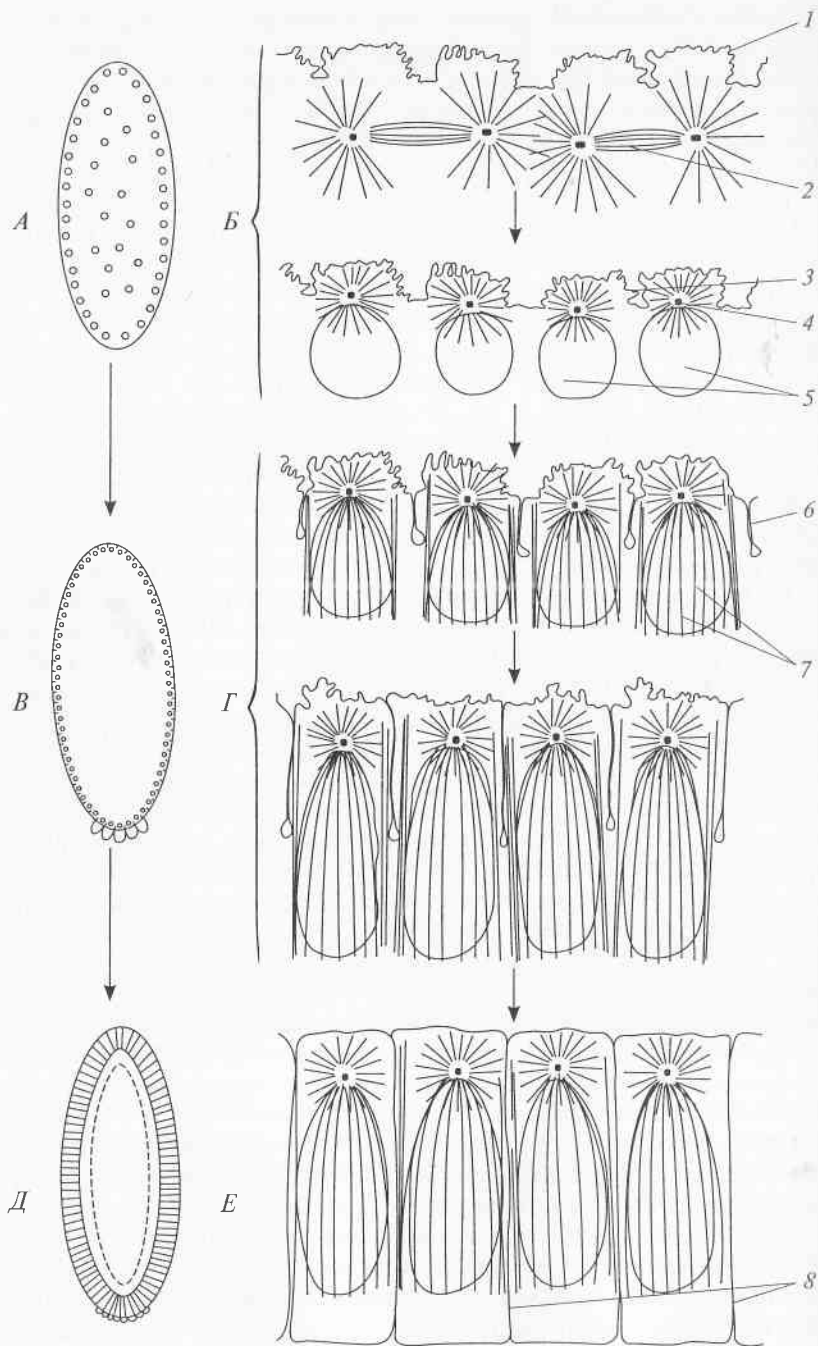


Рис. 28. Формирование клеточной бластодермы перибластулы дрозофилы:

А — стадия синцитиальной бластодермы; Б — строение поверхностного слоя зародыша на стадии синцитиальной бластодермы; В — начало обособления клеток бластодермы; Г — удлинение ядер и формирование цитоскелета вокруг них; Д — стадия клеточной бластодермы; Е — полное обособление клеток бластодермы; 1 — поверхностная мембрана зародыша; 2 — митотическое веретено; 3 — формирующаяся борозда дробления; 4 — звезда веретена; 5 — ядра; 6 — канал борозды; 7 — микротрубочки вокруг ядер; 8 — сформированные клеточные мембраны

обозначая место, где возникнут зародышевые листки. Эта область называется *зародышевой полоской* (рис. 27, 3). Из нее образуются все клетки насекомого. Остальные клетки бластодермы образуют внезародышевые оболочки.

У некоторых низших беспозвоночных (кишечнополостные, паразитические плоские черви) наблюдается *анархическое дробление*, когда бластомеры слабо связаны между собой и вначале располагаются неправильными цепочками.

Часто бластомеры располагаются как при спиральном, радиальном или билатеральном дроблениях, и такие вариации анархического дробления называют соответственно псевдоспиральным, псевдорадiallyм или псевдобилатеральным. Однако подобные типы укладки бластомеров являются случайными и никак не влияют на последующее развитие.

Позже бластомеры компактизируются и формируют морулу, не имеющую бластоцеля.

У моллюсков, червей и некоторых кишечнополостных в конце процесса дробления образуется зародыш со стенкой равномерной толщины и небольшим центрально расположенным бластоцелем. Такая бластула называется *стерробластулой*.

Препараты к занятию «Дробление»

Препараты для данного занятия подобраны таким образом, чтобы показать, как изменяется тип дробления яйцеклеток в зависимости от количества и расположения желтка (олиголецитальные яйцеклетки морского ежа — препарат № 1; мезолецитальные яйцеклетки бесхвостых амфибий — препарат № 2; полилецитальные яйцеклетки выюна — препарат № 3, № 4). Кроме того, на этом занятии предлагается препарат перибластулы насекомых, сформировавшейся в результате поверхностного дробления (препарат № 5).

Особенности дробления яйцеклеток млекопитающих выделены в раздел «**Раннее развитие млекопитающих**».

**Препарат № 1. Целобластула морского ежа
(*Strongylocentrotus* sp.): срез через полость бластоцеля**

Задание. На данном препарате под микроскопом при малом увеличении (объектив $\times 8$) найдите срез целобластулы морского ежа. Если срезов на препарате несколько, выберите тот, который имеет наибольший диаметр. Переведите микроскоп на большое увеличение (объектив $\times 40$) и зарисуйте целобластулу. Обратите внимание на форму клеток и расположение их ядер (рис. 29, А).

Целобластула морского ежа имеет сферическую форму. Однослойная стенка окружает большой бластоцель, занимающий центральное положение. Клеточная стенка целобластулы состоит из клеток цилиндрической формы, ядра располагаются у внутренней поверхности клеток. Гиалиновый слой, а также реснички и апикальный орган на световых препаратах, как правило, не видны. На препаратах ранних целобластул морского ежа может быть видна некоторая разница в размерах клеток анимального и вегетативного полюсов (клетки вегетативного полюса чуть крупнее).

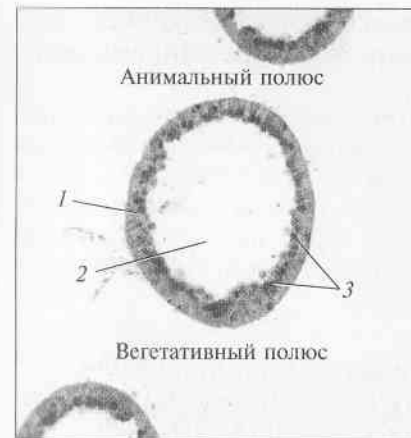
Для данного занятия могут быть использованы также срезы целобластул морских звезд или офиур.

**Препарат № 2. Амфибластула травяной лягушки
(*Rana temporaria*): меридиональный срез**

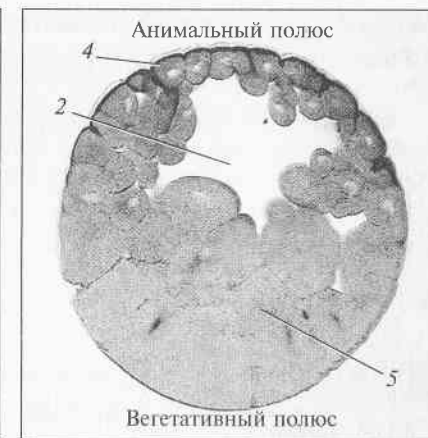
Задание. На данном препарате под микроскопом при малом увеличении (объектив $\times 8$) рассмотрите и зарисуйте общий вид амфибластулы на меридиональном срезе. При зарисовке амфибластулы рекомендуется расположить ее анимальным полюсом вверх или указать на рисунке расположение анимального и вегетативного полюсов. Укажите на рисунке расположение микромеров, мезомеров и макромеров.

Переведите микроскоп на большое увеличение (объектив $\times 40$) и внимательно рассмотрите крышу бластоцеля, обращая внимание на распределение пигмента в клетках. На рисунке покажите распределение пигмента в клетках амфибластулы.

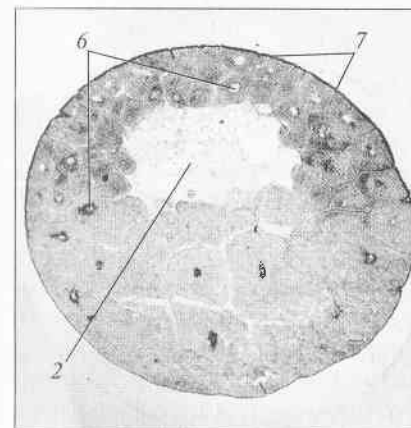
На рис. 29 показаны меридиональные срезы ранней (Б) и поздней (В) амфибластул травяной лягушки. Амфибластула имеет сферическую форму. Ее стенка состоит из нескольких слоев клеток, бластоцель смещен к анимальному полюсу. Анимальная часть стенки амфибластулы (крыша бластоцеля) тоньше, чем массивная вегетативная часть стенки (дно бластоцеля). Более мелкие анимальные бластомеры (микромеры) сильнее пигментированы, содержат меньшее количество желтка и мельче, чем крупные вегета-



А



Б



В

Рис. 29. Строение бластул при полном дроблении (гистологические срезы):

А — целобластула морского ежа (*Strongylocentrotus* sp.); Б — ранняя амфибластула травяной лягушки (*Rana temporaria*); В — поздняя амфибластула травяной лягушки (*Rana temporaria*); 1 — эпителиальная стенка целобластулы; 2 — бластоцель; 3 — базально расположенные ядра клеток стенки целобластулы; 4 — крыша бластоцеля амфибластулы, составленная мелкими бластомерами анимального полюса; 5 — дно бластоцеля амфибластулы, составленное крупными бластомерами вегетативного полюса; 6 — ядра бластомеров; 7 — меланосомы у наружной поверхности бластомеров

тивные бластомеры (макромеры). Между микромерами и макромерами располагается несколько клеток промежуточного размера (мезомеры). Микромеры, относящиеся к разным слоям, составляющим крышу бластоцеля, пигментированы по-разному. Для микромеров, кроме приядерного расположения пигмента, характерно также наличие слоя пигмента вдоль внешнего края клеток. Этот пигмент кортикальной области анимальной части ооцита унаследовали те клетки, которые при дроблении сформировались из этой области зиготы (см. рис. 25). В ранней амфибластуле, когда крыша бластоцеля состоит в основном из одного слоя клеток (рис. 29, Б), такой слой пигмента есть во всех микромерах. В поздней амфибластуле, когда крыша бластоцеля становится многослойной, пигмент наследуют только клетки внешнего слоя (рис. 29, В). При

дальнейшем развитии (стадии гаструляции и нейруляции) можно проследить судьбу потомков этих клеток по наличию пигмента в кортикальной области.

Для данного занятия могут быть использованы также срезы амфибластул других видов бесхвостых амфибий. Если для приготовления срезов используются эмбрионы шпорцевой лягушки (*Xenopus laevis*), то следует отбирать икру наиболее темноокрашенных самок, так как у светлых особей труднее проследить распределение пигмента в клетках амфибластулы, а икра альбиносных особей не пигментирована.

Препарат № 3. Дробление вьюна (*Misgurnus fossilis*): два бластомера, меридиональный срез

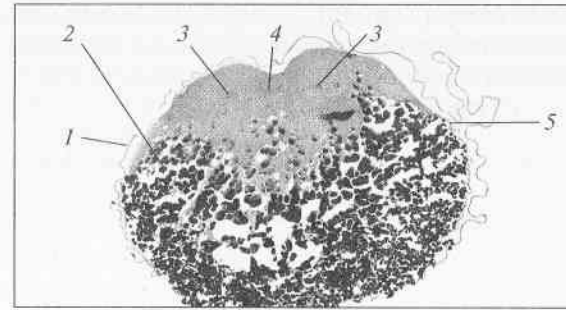
Задание. На данном препарате под микроскопом при малом увеличении (объектив $\times 8$) рассмотрите и зарисуйте общий вид двух бластомеров. При зарисовке рекомендуется расположить эмбрион анимальным полюсом вверх и указать расположение анимального и вегетативного полюсов. На рисунке укажите положение борозды первого деления дробления.

Строение эмбриона вьюна на стадии двух бластомеров показано на рис. 30, А. На препарате видна оболочка оплодотворения, смявшаяся в складки при дегидратации во время приготовления препарата. Борозда первого деления дробления проходит вертикально, цитоплазма основания бластомеров переходит в цитоплазматический слой желточной клетки. Как правило, на таком препарате хорошо видны ядра бластомеров или остатки веретена первого деления дробления. Светлые промежутки между гранулами желтка являются артефактами фиксации и дегидратации материала или дефектами резки.

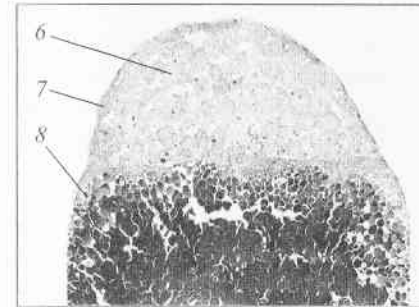
При приготовлении препаратов стадий дробления костистых рыб для студенческого практикума рекомендуется проводить и резать икринки целиком, подбирая условия для лучшей сохран-

Рис. 30. Формирование дискобластулы вьюна (*Misgurnus fossilis*) (гистологические срезы):

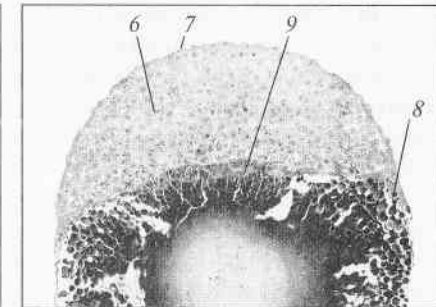
А — стадия двух бластомеров; Б — стадия средней бластулы; В — стадия поздней эпителиальной бластулы; Г — центральный участок нижнего слоя глубоких клеток на стадии средней бластулы; Д — краевая зона бластодермы на стадии средней бластулы; 1 — оболочка оплодотворения; 2 — желточная клетка; 3 — ядра бластомеров; 4 — борозда первого деления дробления; 5 — желточный цитоплазматический слой; 6 — глубокие клетки; 7 — покровный слой; 8 — наружный желточный синцитиальный слой; 9 — внутренний желточный синцитиальный слой; 10 — дочернее ядро разделившегося бластомера; 11 — ядро формирующегося внутреннего желточного синцитиального слоя; 12 — краевой бластомер покровного слоя бластодермы



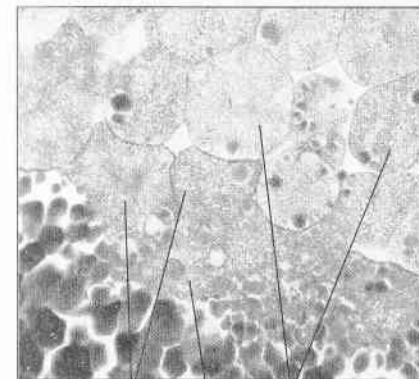
А



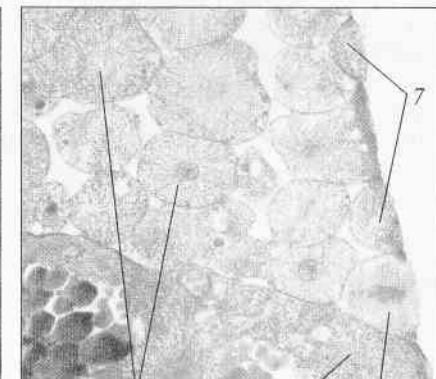
Б



В



Г



Д

ности желтка. В препаратах для исследовательских целей большую часть желтка после фиксации обычно удаляют и гистологические срезы готовят только из анимальной части икринки.

Препарат № 4. Дискобластула вьюна (*Misgurnus fossilis*): меридиональный срез

Задание. На данном препарате под микроскопом при малом увеличении (объектив $\times 8$) рассмотрите и зарисуйте общий вид дискобластулы.

При зарисовке рекомендуется расположить дискобластулу blastодермой вверх или указать на рисунке расположение анимального и вегетативного полюсов. Потом переведите микроскоп на большое увеличение (объектив $\times 40$) и внимательно рассмотрите строение blastодермы.

Обратите внимание на форму клеток покровного слоя и глубоких клеток blastодермы, а также на зоны контактов между клетками покровного слоя. При большом увеличении зарисуйте боковой участок blastодермы.

Дискобластула имеет сферическую форму. На анимальном полюсе дискобластулы располагается небольшой многоклеточный диск, называемый *blastодиском* или *blastодермой*, а дно представлено объемной массой нераздробившегося желтка. Blastодерма состоит из трех клеточных компартментов: покровного слоя, глубоких клеток и желточного синцитиального слоя, продолжающегося в желточный цитоплазматический слой желточной клетки.

Покровный слой состоит из эпителиальных клеток, краевые blastомеры этого слоя соединяются с краевым участком наружного желточного синцитиального слоя. На стадии средней blastулы апикальные поверхности blastомеров покровного слоя выпуклые (рис. 30, Б), а на стадии поздней эпителиальной blastулы клетки покровного слоя заметно уплощаются (рис. 30, В). При большом увеличении хорошо видны зоны плотных контактов, которые объединяют соседние клетки покровного слоя и служат барьером, отделяющим внутреннюю область blastодермы от внешней среды.

Глубокие клетки располагаются между покровным слоем и внутренним желточным синцитиальным слоем. На стадии средней blastулы глубокие клетки крупные, полигональной формы. На стадиях поздней blastулы клетки глубокого слоя становятся мельче, располагаются более рыхло, форма их округлая или округлая с выростами.

Анимальная поверхность желточной клетки представляет собой *желточный синцитиальный слой* (рис. 30, Б—Д). На стадии

средней blastулы наблюдаются деления центральных базальных blastомеров глубокого слоя, при этом ядро дочерней клетки становится ядром внутреннего желточного синцития (рис. 30, Г). На стадии поздней blastулы внутренний и наружный желточные синцитиальные слои полностью сформированы.

Препарат № 5. Перибластула тутового шелкопряда (*Bombyx mori*)

Задание. На данном препарате под микроскопом при малом увеличении (объектив $\times 8$) рассмотрите и зарисуйте общий вид перибластулы. При зарисовке обратите внимание на расположение свободной от желтка цитоплазмы, а также на ядра формирующегося слоя перидермы и ядра вителлофагов в толще желтка (рис. 31, А). Потом переведите микроскоп на большое увеличение (объектив $\times 40$) и внимательно рассмотрите и зарисуйте строение небольшого участка перибластулы. Обратите внимание на формирование клеток перидермы, строение вителлофагов и желтка внутренней области перибластулы (рис. 31, Б, В).

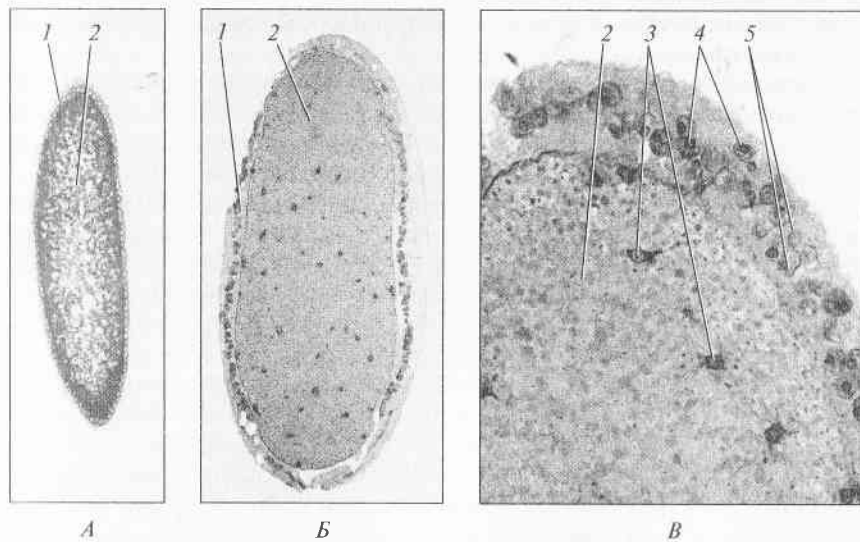


Рис. 31. Строение перибластулы насекомых (гистологические срезы):

А — перибластула дрозофилы (*Drosophila* sp.); Б — перибластула тутового шелкопряда (*Bombyx mori*); В — строение перидермы тутового шелкопряда; 1 — клеточная blastодерма (перидерма); 2 — гранулы желтка; 3 — вителлофаги; 4 — сформированные клетки перидермы; 5 — ядра, еще не окруженные плазматической мембраной

ГАСТРУЛЯЦИЯ У АМФИБИЙ

Перибластула характеризуется следующими признаками: форма эллипсоидная; полости (бластоцеля) не имеет; бластодерма (у насекомых часто называемая *перидермой*) состоит из одного-двух слоев клеток, окружающих желток. У тутового шелкопряда вокруг каждого ядра, мигрировавшего в периферическую область, *de novo* формируется плазматическая мембрана клетки, которая ограничивает ядро и небольшой участок цитоплазмы. Процесс идет по мере того, как ядра мигрируют на периферию, и на одном участке перидермы можно увидеть все его этапы: полностью сформированные клетки; ядра, вокруг которых только начала формироваться плазматическая мембрана; ядра, недавно пришедшие в зону периферической цитоплазмы, вокруг которых еще не начали формироваться структуры клетки (рис. 31, В). Большая часть периферической цитоплазмы и плазматическая мембрана ооцита в состав клеток перидермы у тутового шелкопряда не входят. *Вителлофаги*, функцией которых является утилизация желтка, представляют собой ядра, расположенные в толще желтка и окруженные небольшими участками цитоплазмы звездчатой формы. Вителлофаги не имеют собственной плазматической мембраны, их цитоплазма непосредственно контактирует с желтком. Отдельные вителлофаги соединены между собой тонкими тяжами цитоплазмы в единый синцитий (*синцитиальную сеть*). На препарате эти тяжи цитоплазмы видны под большим увеличением как более темные точки, лежащие среди более светлых и крупных гранул желтка.

Для данного занятия могут быть использованы также срезы перибластулы дрозофилы (рис. 31, В). Однако ооциты дрозофилы меньше, чем ооциты тутового шелкопряда, и детали их строения нужно изучать под большим увеличением.

Дополнительное задание. Наблюдения за процессами дробления и формирования дискобластулы выюна. Подробное описание этого задания приведено в разделе «Рыбы. Работа с живым материалом (развитие эмбрионов выюна)».

Эпителиальная бластула вступает в следующий этап развития — *гаструляцию*. Это период интенсивных морфогенетических движений клеток. У разных видов амфибий имеются различия в протекании гаструляции, однако в результате все они приходят к единой конечной цели: три зародышевых листка занимают свое definitivo положение (*эктодерма* — снаружи, *энтодерма* — внутри и *мезодерма* — между эктодермой и энтодермой) и в самых общих чертах намечается план строения будущего организма.

Исследование процесса гаструляции у амфибий — одна из старейших областей экспериментальной эмбриологии. Наши представления об индукционных взаимодействиях эмбриональных клеток и их роли в развитии многим обязаны исследованиям в этой области. В последние десятилетия исследования молекулярных механизмов гаструляции амфибий ведутся преимущественно на шпорцевой лягушке *Xenopus laevis*.

Движения клеток при гаструляции

При наблюдении за процессом развития с помощью стереомикроскопа можно видеть, что гаструляция начинается с концентрации пигмента в виде полоски ниже линии экватора в области серого серпа (рис. 32). Клетки этой области сокращают свою наружную (апикальную) поверхность и значительно увеличивают площадь базолатеральных мембран. Они приобретают *колбовидную* форму и начинают погружаться в глубь зародыша, сохраняя при этом связь с его поверхностью. В результате на будущей дорсальной стороне зародыша образуется щелевидный *бластопор*. Его анимальный край получил название *дорсальной губы* бластопора. Щель бластопора продолжает углубляться и удлиняться, охватывая дугой вегетативную массу желточных клеток, — образуются *боковые, или латеральные, губы бластопора*. Возникающая полость носит название *первичной кишки* (или *архентерон*). Когда бластопор замыкается в кольцо на брюшной стороне зародыша, образуется *вентральная губа бластопора*. Клетки вегетативной желточной массы внутри кольцевого бластопора получили название *желточной пробки*.

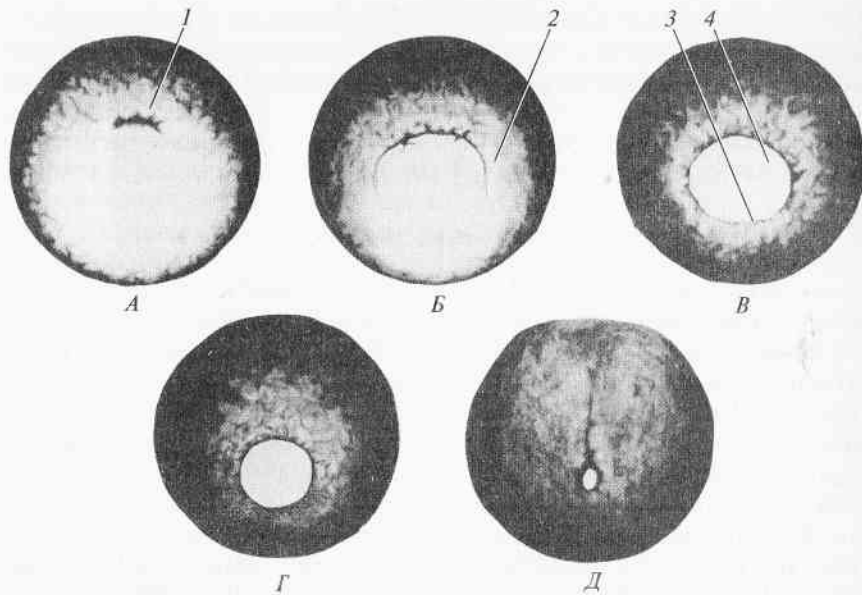


Рис. 32. Вид с вегетативного полюса на зародыш шпорцевой лягушки (*Xenopus laevis*) в процессе гастрюляции.

Формирование дорсальной (А), латеральных (Б) и вентральной (В) губ бластопора. Кольцевой бластопор постепенно сокращается в диаметре (Г), желточная пробка погружается внутрь (Д). Дорсальная сторона зародыша растягивается. Внутреннее строение зародышей этих стадий показано на цветной вклейке I. 1 — дорсальная губа бластопора; 2 — латеральная губа бластопора; 3 — вентральная губа бластопора; 4 — желточная пробка

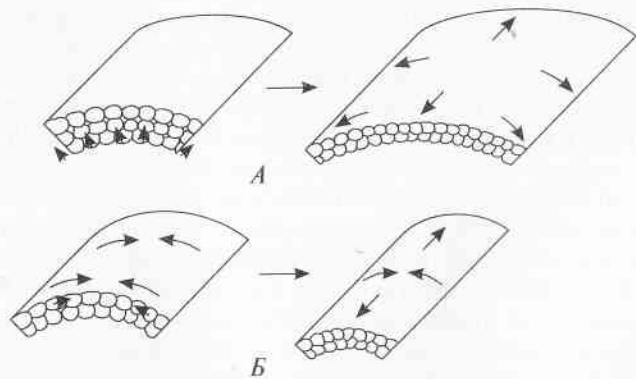


Рис. 33. Движения клеток и преобразование пласта при эпиболии (А), латеро-медиальной миграции и конвергентном растяжении (Б) при гастрюляции у амфибий

У зародыша шпорцевой лягушки (*Xenopus laevis*) можно выделить ряд зон в соответствии с их положением, поведением в процессе гастрюляции, а также дальнейшей судьбой клеток (цв. вкл. I, А).

Наиболее анимальная часть зародыша — пласт из 3—4 слоев самых мелких клеток называют *крышей бластоцеля*. Крупные, богатые желтком клетки вегетативного полюса зародыша получили название *вегетативной желточной массы*. В экваториальной области зародыша, называемой *маргинальной, или краевой, зоной*, следует выделить *поверхностный слой клеток краевой зоны* и толщу *глубоких клеток краевой зоны*.

Следующая фаза гастрюляции включает подворачивание (*инволюцию*) и миграцию клеток краевой зоны зародыша. Первые колбовидные клетки на дорсальной стороне зародыша, погружившись внутрь, начинают активно двигаться в анимальном направлении, увлекая за собой клетки краевой зоны, в том числе и образующиеся в латеральных губах колбовидные (цв. вкл. I, А, Б).

Клетки поверхностного слоя и подповерхностные клетки маргинальной зоны сначала смещаются в вегетативном направлении к щели бластопора, а достигнув ее, подворачиваются внутрь и продолжают двигаться единой массой уже в анимальном направлении вдоль внутренней поверхности крыши бластоцеля. Таким образом, клетки в губах бластопора постоянно обновляются.

Подворачивание и миграция активнее совершаются на дорсальной стороне зародыша. Ползущие по крыше бластоцеля клетки на дорсальной стороне зародыша заметно обгоняют вентральные (цв. вкл. I, Б, Г). Гастральное впячивание также значительно глубже на дорсальной стороне.

Роль колбовидных клеток в запуске и поддержании гастрюляционных движений различается у бесхвостых и хвостатых амфибий. У *Xenopus laevis* колбовидные клетки инициируют начало движений, но позже могут быть изолированы, однако инволюция и миграция клеток маргинальной зоны продолжают. У тритона и саламандры ползущие по крыше бластоцеля колбовидные клетки являются ведущим краем подвернувшихся клеток краевой зоны на протяжении всей гастрюляции. Изоляция этих клеток на ранних этапах гастрюляции приводит к остановке гастрюляционных движений.

Со стадии средней гастрюлы (образование кольцевого бластопора) возникает дополнительное направление движения (цв. вкл. I, В). Клетки всех слоев маргинальной зоны начинают смещаться из более латеральных областей (справа и слева) к дорсальной медиальной плоскости зародыша и здесь встраиваются друг между другом (*интеркаляция*). Это латеро-медиальное (или вентро-дорсальное) смещение клеточного материала и интеркаляция на дорсальной стороне зародыша приводят к значительному растяже-

нию всех пластов в продольном (анимально-вегетативном) направлении (рис. 33, Б). Дорсальная сторона зародыша вытягивается. Архентерон при этом сильно удлиняется в анимальном направлении. Описанные выше движения клеток получили название *латеро-медиальной миграции* и *конвергентного растяжения*.

Следует напомнить, что интеркаляция клеток в радиальном направлении (или *радиальная интеркаляция*) (рис. 33, А), начавшись еще на стадиях позднего дробления и бластуляции, продолжается в течение всей гастрюляции амфибий. За время гастрюляции клетки трижды успевают пройти митотический цикл. Таким образом, их количество увеличивается примерно в 8 раз и соответственно уменьшаются их размеры. К концу гастрюляции глубокие клетки крыши blastoцеля, а также подповерхностные клетки краевой зоны из пластов, содержащих 3—4 слоя клеток, интегрируются в однослойный пласт большей площади. Слой поверхностных клеток благодаря делениям становится тоньше, и его клетки дополнительно распластываются. В результате таких клеточных перестроек анимальное полушарие зародыша обрывается клетками вегетативное полушарие. Это явление получило название *эпиболии*.

Эпиболия в сочетании с конвергентным растяжением дорсальной стороны зародыша, а также инволюцией клеток желточной пробки приводят к постепенному сокращению диаметра кольцевого blastoпора (см. рис. 32, Г, Д). Гастрюляция завершается, когда кольцо blastoпора сокращается до точки, вся желточная пробка погружается внутрь зародыша, а клетки анимального полушария покрывают всю поверхность вегетативного. Точечный blastoпор (*гастропор*) становится анальным отверстием будущего животного. Его положение не совпадает с вегетативным полюсом яйца (и blastoулы), а сдвинуто вентральнее вследствие более интенсивных клеточных движений на дорсальной стороне зародыша.

Карта презумптивных зачатков шпорцевой лягушки (*Xenopus laevis*)

Благодаря технике использования витальных красителей и люминесцентных маркеров удалось проследить поведение различных зон blastoулы амфибий в течение гастрюляции, а также выяснить их дальнейшую судьбу. На основе этих данных удалось составить карты расположения зачатков различных органов и тканей на стадии blastoулы, еще до начала гастрюляционных движений и дифференцировки.

На цв. вкл. II приводятся такие *карты презумптивных (предполагаемых) зачатков* для бесхвостых (*Anura*) и хвостатых (*Urodela*) амфибий. У blastoулы хвостатых амфибий меньше слоев глубоких

клеток в крыше и маргинальной зоне (1—2 против 3—4 у *Anura*), чем и обусловлены различия в расположении зачатков в поверхностном слое маргинальной зоны.

Клетки анимальной шапочки обрастают вегетативное полушарие в ходе гастрюляции, и в дальнейшем формируют из вентро-анимальной части *покровный эпителий*, а из дорсо-анимальной — *нейральную пластинку* (цв. вкл. II, А, В).

Колбовидные клетки, а также клетки поверхностного слоя краевой зоны инвагинируют и образуют спинную стенку архентерона, причем клетки дорсальной губы образуют выстилку головной кишки (глотки), а клетки латеральных и вентральной губ войдут в состав задних отделов кишки. Брюшная стенка архентерона образуется из погружающихся клеток вегетативного полюса, поэтому вегетативный полюс blastoулы и поверхностный слой краевой зоны обозначены на карте для бесхвостых амфибий как закладка *энтодермы*.

Мезодермальные закладки у *Xenopus laevis* и других *Anura* располагаются в маргинальной зоне под слоем поверхностных клеток (цв. вкл. II, Б). Над щелевым blastoпором на дорсальной стороне располагается зачаток так называемой *прехордальной пластинки*. Клетки этого зачатка подворачиваются первыми и впоследствии сформируют мезэнхиму головы (цв. вкл. II, Г). Анимальнее располагается зачаток *хорды*, далее анимальнее и латеральнее — *мезодерма сомитов*. Из более вентральных отделов формируются *латеральная пластинка* несегментированной мезодермы зародыша и ее производные. *Сердце* и *кроветворные островки* (зачаток эмбрионального кроветворения) образуются из наиболее вегетативных клеток в латеральных и вентральной частях краевой зоны.

У *Urodela* мезодермальные закладки располагаются в краевой зоне сходным образом, однако выходят прямо на поверхность зародыша (на цв. вкл. II сравните поз. А—В). В результате инвагинации при гастрюляции презумптивные мезодермальные клетки поверхностного слоя оказываются в составе дорсальной стенки архентерона. Позже энтодермальные клетки вентральной стенки архентерона наползают на дорсальную сторону и изолируют мезодермальные клетки от просвета первичной кишки (архентерона). Высланная уже исключительно энтодермальными клетками полость называется дефинитивной (окончательной) кишкой.

Следует подчеркнуть, что карты презумптивных зачатков дают информацию о судьбе определенных зон blastoулы в ходе нормального развития, но ничего не говорят о степени детерминированности клеток этих зон к формированию определенных структур и конкретной дифференцировке. Экспериментально показано, что на стадии blastoулы клетки амфибий еще очень пластичны, и дифференцировка их может быть легко изменена различными условиями.

Препараты к занятию «Гаструляция у амфибий»

Препараты занятия 5 демонстрируют процесс формирования трех зародышевых листков во время гаструляции амфибий. Последовательная зарисовка эктодермы, мезодермы и энтодермы на сагиттальных срезах дает представления о механизме этого процесса. Поперечный срез поздней гаструлы представляет эмбрион в том же ракурсе, что и на препаратах к занятию «Нейруляция у амфибий».

Студентам предлагаются препараты гаструл африканской шпорцевой лягушки (*Xenopus laevis*). На этом виде выполняется большое число исследований в современной эмбриологии, вид широко используется в качестве экспериментального объекта в научных лабораториях. Но для этого занятия также могут быть использованы срезы гаструл других видов бесхвостых амфибий, например травяной лягушки (*Rana temporaria*).

Препарат № 1. Сагиттальный срез зародыша шпорцевой лягушки на стадии ранней гаструлы

Задание. Рассмотрите при малом увеличении (объектив $\times 8$) и зарисуйте сагиттальный срез ранней гаструлы. Определите на препарате анимальный и вегетативный полюса зародыша, а также его дорсальную и вентральную стороны. Укажите их на рисунке. Сравните смещение в результате эпиболлии анимального пигментированного материала на дорсальной и вентральной сторонах. Определите количество слоев клеток в крыше бластоцеля. Потом переведите микроскоп на большое увеличение (объектив $\times 40$), рассмотрите и зарисуйте область формирования дорсальной губы бластопора и участок крыши бластоцеля, обращая внимание на распределение пигмента в клетках этих областей.

Сагиттальный срез зародыша на стадии ранней гаструлы показан на рис. 34, А. Поверхностные клетки анимального полюса содержат гранулы пигмента под наружной мембраной. В крупных клетках вегетативного полюса пигмент отсутствует. На дорсальной стороне зародыша образовался веер колбовидных клеток, которые хорошо различимы благодаря характерной форме и концентрации пигмента в их «шейках» при сокращении наружной поверхности. Клетки погружаются вглубь, сохраняя связь с поверхностью. Щелевидный бластопор срезан поперек. Его закругленный анимальный край и есть дорсальная губа бластопора, через которую подворачивается материал краевой зоны. Клетки поверхностного и подповерхностных слоев сначала смещаются вегетативно, а затем вместе с колбовидными клетками двигают-

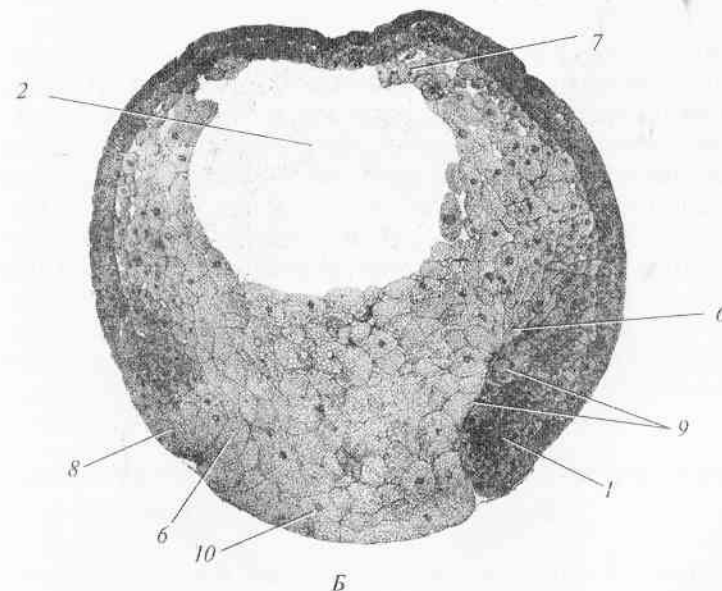
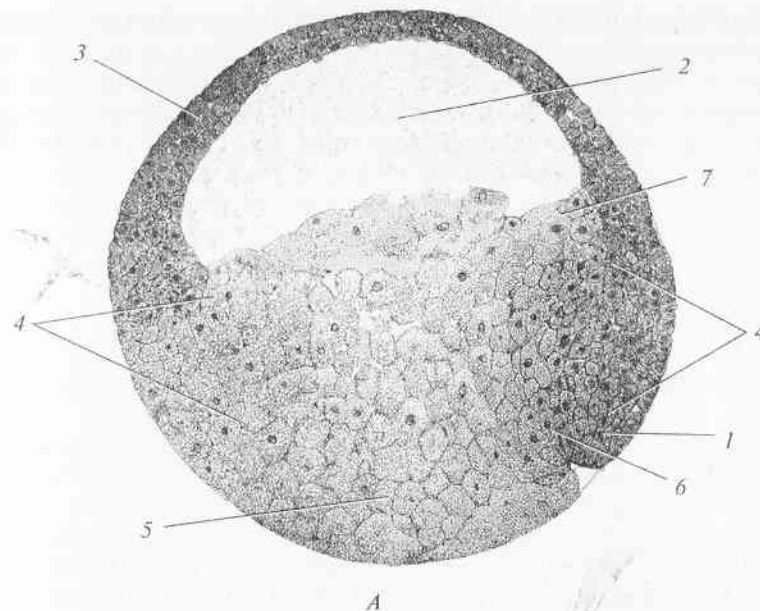


Рис. 34. Сагиттальный срез ранней (А) и средней (Б) гаструлы зародыша шпорцевой лягушки (*Xenopus laevis*):

1 — дорсальная губа; 2 — бластоцель; 3 — анимальная шапочка; 4 — краевая зона; 5 — вегетативная желточная масса; 6 — колбовидные клетки; 7 — головная эндомезодерма; 8 — вентральная губа; 9 — архентерон; 10 — желточная пробка

ся в анимальном направлении. С вентральной стороны зародыша подобных движений пока нет. Крупные клетки головной энтодермы и мезодермы, расположенные в углу бластоцеля на дорсальной стороне, начинают распластываться и ползти в анимальном направлении по внутренней стенке крыши бластоцеля. Продолжается радиальная интеркаляция в крыше бластоцеля. Процесс более активно идет на дорсальной стороне, поэтому крыша здесь состоит из двух слоев клеток (на вентральной стороне — из 3—5 клеток).

Препарат № 2. Сагиттальный срез зародыша шпорцевой лягушки на стадии средней гастрюлы

Задание. Рассмотрите и зарисуйте сагиттальный срез ранней гастрюлы. Укажите на рисунке расположение анимального и вегетативного полюсов гастрюлы, а также — дорсальную и вентральную стороны зародыша. Обратите внимание на смещение дорсальных колбовидных клеток в направлении анимального полюса, на положение мигрирующей по крыше бластоцеля головной энтомезодермы, на колбовидные клетки вентральной губы.

Сагиттальный срез зародыша на стадии средней гастрюлы показан на рис. 34, Б. С образованием вентральной губы бластопор становится кольцевым. На дорсальной стороне зародыша клетки краевой зоны продолжают подворачиваться внутрь зародыша, а затем мигрировать в анимальном направлении. Лидирующий край этой клеточной массы мигрирует по стенке бластоцеля. Он состоит из крупных клеток энтодермы и головной мезодермы. Архентерон становится глубже. Его дорсальная стенка (или крыша) образована подвернувшимися энтодермальными клетками поверхностного слоя краевой зоны, а вентральная стенка (или дно) — погружившимися клетками желточной пробки. В результате радиальной интеркаляции эктодерма стала двуслойной.

Препарат № 3. Сагиттальный срез поздней гастрюлы зародыша шпорцевой лягушки

Задание. Рассмотрите и зарисуйте сагиттальный срез поздней гастрюлы. Укажите на рисунке расположение анимального и вегетативного полюсов гастрюлы, а также — дорсальную и вентральную стороны зародыша. Обратите внимание на положение мезодермальных клеток, подвернувшихся во внутрь через дорсальную и вентральную губы бластопора поздней гастрюлы. Найдите полости гастрюлы, бластоцеля, желточную пробку.

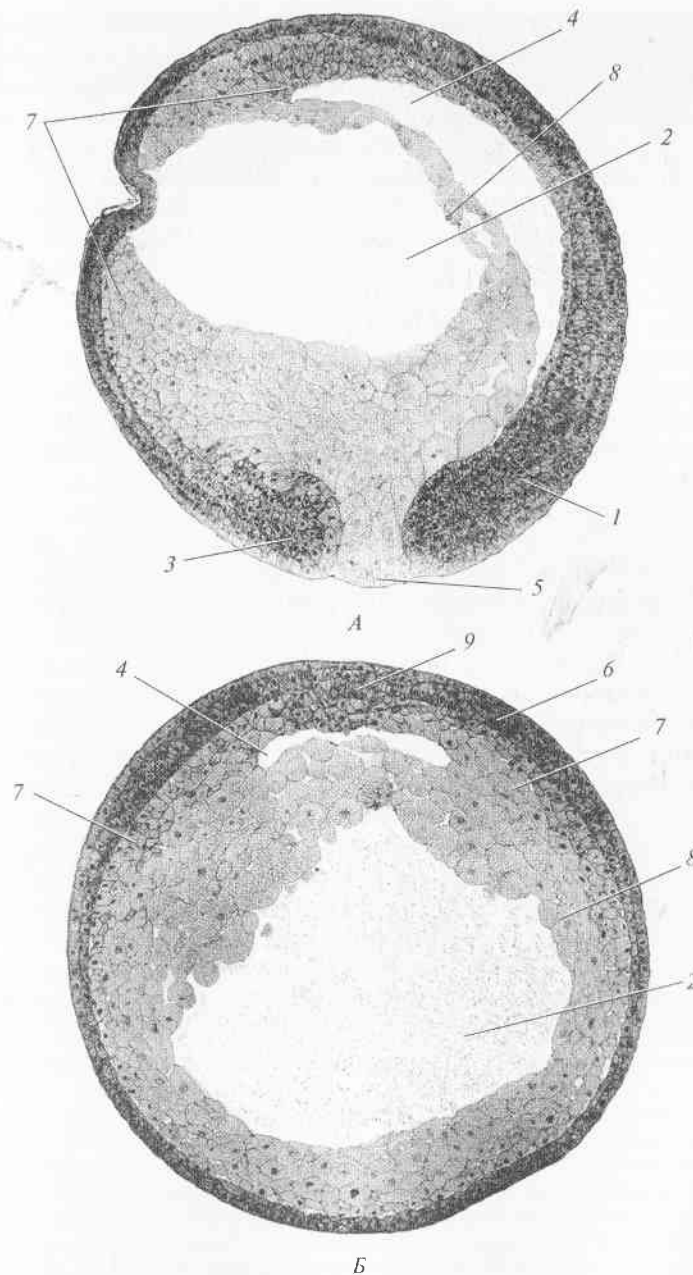


Рис. 35. Сагиттальный срез (А) и центральный поперечный срез (Б) поздней гастрюлы зародыша шпорцевой лягушки (*Xenopus laevis*): 1 — дорсальная губа; 2 — бластоцель; 3 — вентральная губа; 4 — архентерон; 5 — желточная пробка; 6 — эктодерма; 7 — мезодерма; 8 — энтодерма; 9 — хорда

Сагиттальный срез зародыша на стадии поздней гастролы показан на рис. 35, А. Лидирующий край дорсальной мезодермы достиг анимального полюса. При встрече дорсального и вентрального потоков мезодермы бластоцель оттесняется от эктодермы вглубь. Видно, что в результате латеро-медиальной миграции клеток во всех слоях краевой зоны в дорсальном направлении и их конвергентного встраивания спинная сторона зародыша вытянулась. Резко удлинился архентерон, появилась гастральная полость. Колбовидные клетки образовали эпителиальную выстилку архентерона в головной части. Бластоцель сместился на вентральную сторону зародыша. Вентральная губа стала незначительно глубже. Бластопор сократился в диаметре благодаря эпиболлии, конвергентному растяжению и погружению клеток желточной пробки. Сократилось количество слоев клеток в мезодерме. На дорсальной стороне в подвернувшейся мезодерме можно видеть начало формирования хорды.

Препарат № 4. Поперечный срез зародыша шпорцевой лягушки на стадии поздней гастролы

Задание. Рассмотрите и зарисуйте сагиттальный срез поздней гастролы. Укажите на рисунке расположение дорсальной и вентральной сторон зародыша. Найдите полости гастроцеля, бластоцеля, границы трех зародышевых листков: эктодермы, мезодермы, энтодермы. Оцените количество клеточных слоев в них.

Поперечный срез зародыша на стадии поздней гастролы показан на рис. 35, Б. В поздней гастроле хорошо видны все три зародышевых листка, занявшие свое окончательное положение: снаружи — двуслойная эктодерма, затем — мезодерма, внутри —

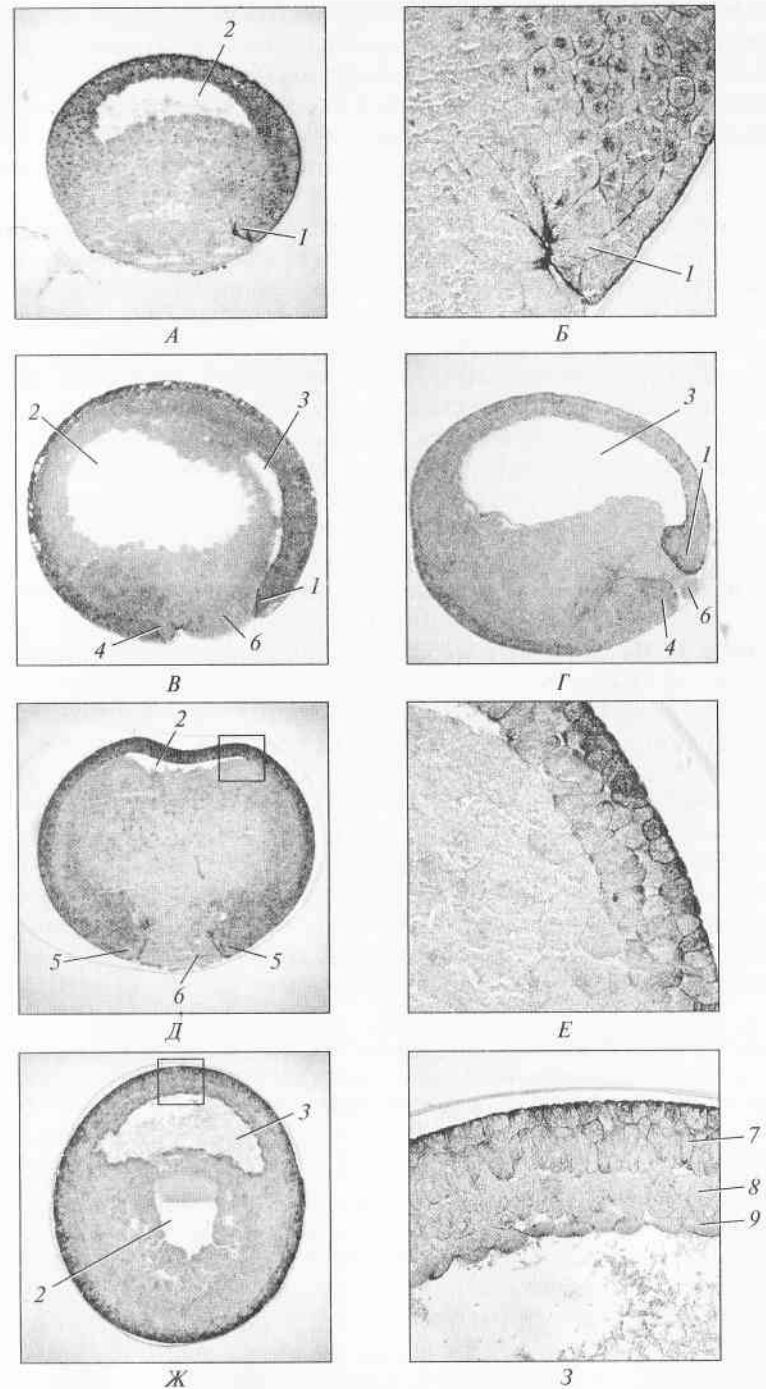


Рис. 36. Эмбрион лягушки (*Rana temporaria*) в процессе гастрюляции:

А — ранняя гастрולה (сагиттальный срез); Б — дорсальная губа бластопора ранней гастролы (сагиттальный срез), видны колбовидные клетки, формирующие щелевидный бластопор; В — средняя гастрולה (сагиттальный срез). С закладкой вентральной губы сформировался кольцевой бластопор; Г — поздняя гастрולה (сагиттальный срез). Гастроцель значительно увеличивается в размерах и достиг переднего отдела эмбриона, желточная пробка сократилась в размерах; Д — средняя гастрולה (фронтальный срез); Е — фрагмент, выделенный рамкой на рис. Д при большом увеличении. Видно уменьшение количества слоев клеток в крыше бластоцеля путем радиальной интеркаляции; Ж — средняя гастрולה (поперечный срез); З — фрагмент, выделенный рамкой на рис. Ж при большом увеличении. Видны клетки трех зародышевых листков, составляющие дорсальную стенку гастроцеля (дву- и трехслойная эктодерма, мезодерма, однослойная энтодерма); 1 — дорсальная губа; 2 — бластоцель; 3 — гастроцель; 4 — вентральная губа бластопора; 5 — латеральная губа бластопора; 6 — желточная пробка; 7 — эктодерма; 8 — мезодерма; 9 — энтодерма

крупные клетки энтодермы. Слой мезодермы на дорсальной стороне утолщен благодаря вентродорсальной миграции клеток. В центре мезодермального пласта на дорсальной стороне выделяется розетка клеток — это формируется тяж хордальных клеток. Щелевидная полость гастроцеля окружена энтодермальными клетками с крупными гранулами желтка. Блостоцель смещен к вентральной стороне зародыша.

Для проведения занятия могут быть использованы препараты гаструл бесхвостых амфибий, например травяной лягушки (*Rana temporaria*) (рис. 36).

ЗАНЯТИЕ 6

НЕЙРУЛЯЦИЯ У АМФИБИЙ

Во время гастрюляции под действием клеток презумптивной мезодермы часть эктодермы гастрюлы (см. карты презумптивных зачатков на цв. вкл. II) приобретает потенции к образованию нейральных структур. Гастрюляционные движения клеток без какого-либо перерыва реорганизуются в движения, приводящие к формированию *нейральной пластинки* и сворачиванию ее в *нервную трубку*. Этот период развития получил название «нейруляция», а зародыш в процессе нейруляции называют *нейрулой* (цв. вкл. III). Передний расширенный отдел нервной трубки впоследствии станет головным, а задний — спинным мозгом животного. Кроме скручивания нейральной пластинки в этот период происходят и другие комплексные преобразования: оформляется хорда, выделяется мезодерма будущих сомитов, начинается сомитогенез.

Рассмотрим подробнее эти процессы на примере развития шпорцевой лягушки (*Xenopus laevis*).

Формирование нейральной пластинки

В течение всей нейруляции продолжают вентродорсальные движения клеток в эктодермальном и мезодермальном листках. Конвергентная интеркаляция вызывает растяжение дорсальной стороны зародыша в передне-заднем направлении, причем туловищный отдел вытягивается значительно сильнее, чем головной.

Клетки подповерхностного слоя эктодермы (гипоэктодерма) смещаются на спину зародыша и образуют здесь столбчатый эпителий. В результате этого спинная сторона зародыша уплощается и приподнимается, образуется *нервная пластинка* (цв. вкл. III). Границы нервной пластинки устанавливаются в результате индукционных взаимодействий клеток. Индукционные взаимодействия, при которых осевая мезодерма воздействует на презумптивную нейроэктодерму, побуждая ее формировать нейральные структуры, называют *нейральной*, или *первичной*, *эмбриональной индукцией*. Не вдаваясь в детали, напомним, что прехордальная пластинка и хорда, а также головная эндомезодерма являются главными источниками нейрализирующих агентов. Двигаясь вдоль

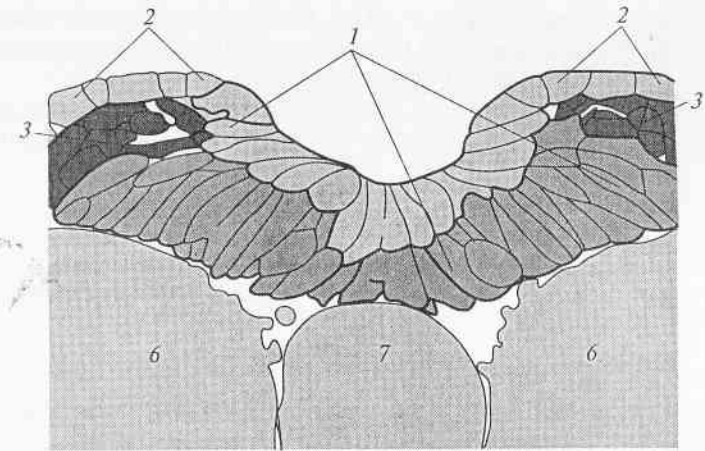
средней линии гастролы в анимальном направлении, они нейрализуют клетки вышележащей эктодермы. Эти медиальные клетки нейральной пластинки, лежащие над хордой, становятся источником вторичных нейрализирующих влияний, которые распространяются латерально от средней линии по эктодермальному пласту. Латеральные границы нейральной пластинки возникают в зоне, где нейрализирующий сигнал сталкивается с утратой способности эктодермы к восприятию этого сигнала (потеря компетенции). В результате поверхность зародыша разделяется на три зоны — нейроэктодерму, покровную эктодерму и пограничную область клеток нервного гребня.

Образование нервного желобка и нервной трубки

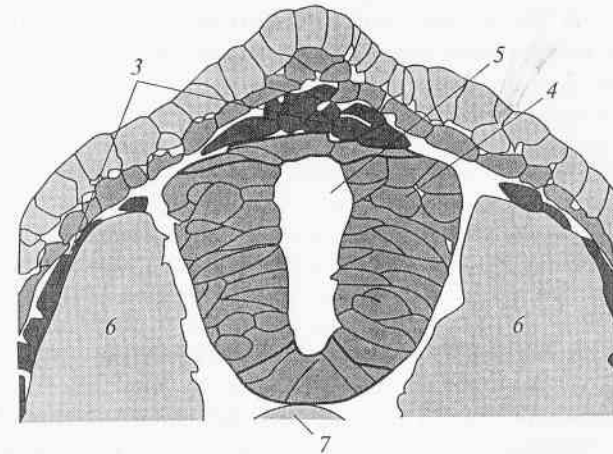
По краям нервной пластинки образуется подковообразный *нервный валик*. Нервная пластинка внутри валика начинает быстро сужаться и изгибаться в желоб. Этому способствуют как конвергентные движения клеток и продольное растяжение, так и изменения формы клеток. Вдоль срединной линии пластинки образуются уже знакомые нам колбовидные клетки и продольный желобок (рис. 37, А). Клетки обоих слоев нервной пластинки вытягиваются перпендикулярно пласту, их апикальные поверхности сокращаются, при этом клетки поверхностного слоя погружаются вглубь и перемешиваются с клетками слоя гипозектодермы. Эти центральные клетки прочно связаны с нижележащей закладкой хорды. Крайя же нервной пластинки поднимаются вверх под давлением лежащей ниже сомитной мезодермы (рис. 38).

Нервные валики сближаются и приходят в контакт. Нейруляция заканчивается, когда нервный желоб замыкается в *нервную трубку*, покровная эктодерма сливается над ней в сплошной двухслойный эпителий, а из материала нервных валиков образуется отдельный продольный тяж клеток — *нервный гребень* (рис. 37, Б). Полость внутри нервной трубки называется *невроцелем*. Она открывается наружу на переднем конце *невропором*. На заднем конце полость связана с гастроцелем посредством *нервно-кишечного канала*. Передняя расширенная часть нервной трубки превратится в головной мозг, а ее полость — в полость мозгового пузыря. Задняя узкая часть нервной трубки станет спинным мозгом, а полость — спинно-мозговым каналом.

Уже в процессе замыкания нервной трубки клетки нервного гребня приобретают подвижность и мигрируют дорсовентрально. Эти клетки демонстрируют удивительно широкий спектр дифференцировок. В головном отделе потомки клеток нервного гребня обнаруживаются в составе костей, хрящей и гладкой мускулатуры лицевой части, косточек среднего уха, одонтобластов зубных зачатков,



А



Б

Рис. 37. Формообразовательные движения клеток при скручивании нервной пластинки в трубку:

А — клетки поверхностного слоя нервной пластинки вытягиваются и проникают между клетками нижележащего слоя; Б — поверхностные клетки нервных валиков сливаются в сплошной слой покровной эктодермы. Подповерхностный слой клеток валиков образует нервный гребень, клетки которого сразу способны мигрировать; 1 — нервная пластинка; 2 — нервные валики; 3 — нервный гребень; 4 — нервная трубка; 5 — невроцель; 6 — мезодерма сомитов; 7 — хорда

соединительной ткани лицевой части, щитовидной и слюнных желез, а также дифференцируются в периферические нейроны и глию. В туловищном отделе клетки нервного гребня образуют пигментные клетки кожи — меланоциты, а также нейроны и глию перифе-

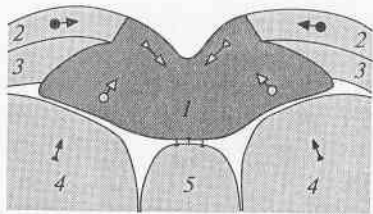


Рис. 38. Диаграмма механических сил, вызывающих скручивание нервного желобка.

В основе этого процесса лежат изменения архитектуры клеток: сокращение апикальной поверхности клеток ($\leftarrow\leftarrow$) и удлинение клеток нервной пластинки ($\leftarrow\circ$), удлинение клеток сомитов ($\leftarrow\leftarrow$) и конвергентные движения в эктодерме ($\leftarrow\bullet$). Хорда и дно нервного желобка связаны силами адгезии. 1 — нервная пластинка; 2 — эктодерма; 3 — нервный гребень; 4 — мезодерма сомитов; 5 — хорда

рической нервной системы, включая дорсальные сенсорные ганглии и ганглии симпатической и парасимпатической систем.

У хвостатых амфибий нейруляция протекает сходным образом, с тем отличием, что эктодерма у них однослойная. Образование колбовидных клеток, сокращение апикальных поверхностей и удлинение клеток происходит в единственном поверхностном слое эктодермы.

Преобразования мезодермы в ходе нейруляции

У шпорцевой лягушки еще на конечной стадии гастрюляции в слое мезодермы в центральной сагиттальной плоскости начинает выделяться тяж из 12—15 клеток, видимый на поперечном срезе (см. рис. 35, Б). Это образуется хорда в месте встречи конвергентных потоков мезодермальных клеток. Конвергентные движения продолжаются внутри хордальной закладки (рис. 39). В результате к концу нейруляции хорда значительно вытягивается в передне-заднем направлении и истончается (на поперечном срезе до 5—6 клеток: сравните хорду на рис. 40, Б и 41, А).

Латеральнее хорды располагается мезодерма будущих сомитов. Мезодерма скапливается на дорсальной стороне в ходе вентро-дорсального движения клеток (см. рис. 38). С середины нейруляции начинается *метамеризация мезодермы*: она последовательно разделяется на отдельные парные сегменты (*сомиты*). Процесс движется от головы к хвосту, примерно каждый час формируется новая пара сомитов (рис. 39). Клетки эпителизуются, сильно вытягиваются в поперечном направлении, а затем совершают поворот на 90°, ориентируясь уже вдоль оси зародыша. Внутри сомита шизоцельным путем образуется вторичная полость тела — *целом*. Целом соединяется со щелью, разделяющей два слоя *латеральной пластинки мезодермы*. Наружный слой получил название *париетально-го листка*, внутренний — *висцерального*. Головные сомиты отлича-

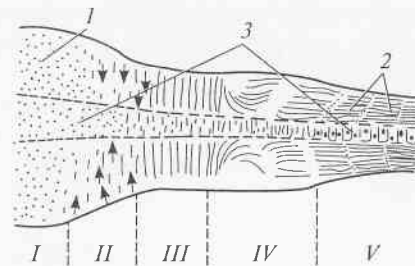


Рис. 39. Движения клеток мезодермы в процессе образования хорды и сомитов.

В осевой мезодерме на фронтальном срезе можно видеть пять зон, соответствующих фазам формирования сомита: I — зона пресомитной мезодермы; II — зона эпителизации клеток в плоскости, перпендикулярной продольной оси; III — сомит, ориентированный перпендикулярно оси; IV — зона ротации сомита; V — зрелые сомиты; 1 — пресомитная мезодерма; 2 — сомиты; 3 — хорда

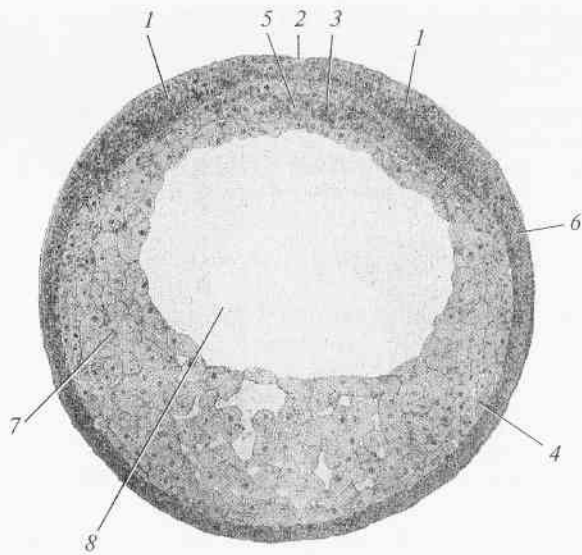
ются от туловищных: они распадаются сразу после образования, однако следы метамеризации головы сохраняются в виде парных закладок жаберных дуг, нервов и т.д. Туловищные сомиты в ходе дальнейшего развития разделяются на три зоны: *дерматом* — стенка сомита, прилежащая к эктодерме; *склеротом* — часть сомита, обращенная к хорде; *миотом*, лежащий между первыми двумя. Потомки клеток дерматома позже образуют дермальный слой кожи, склеротома — метамерный осевой скелет, миотома — поперечно-полосатую мускулатуру.

Препараты к занятию «Нейруляция у амфибий»

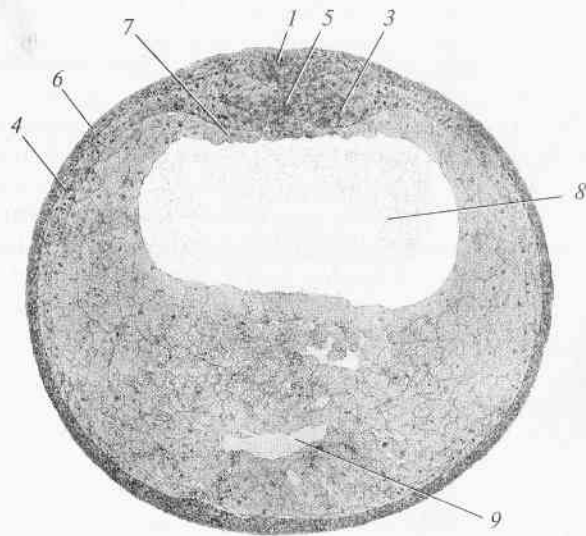
На препаратах к занятию 6 демонстрируются процессы, происходящие при нейруляции у амфибий. Представлены поперечные срезы ранней, средней и поздней нейрулы зародышей шпорцевой лягушки (*Xenopus laevis*), а также парасагиттальный срез поздней нейрулы.

Препарат № 1. Поперечный срез зародыша шпорцевой лягушки на стадии ранней нейрулы

Задание. Рассмотрите при малом увеличении (объектив $\times 8$) и зарисуйте срез ранней нейрулы (рис. 40, А). Укажите на рисунке расположение дорсальной и вентральной стороны зародыша. Определите границы всех трех зародышевых листков. Найдите гастроцель, нервную пластинку, дорсальную сомитную мезодерму. Потом переведите микроскоп на большое увеличение (объек-



А



Б

Рис. 40. Зародыш шпорцевой лягушки (*Xenopus laevis*) на начальных этапах нейруляции:

А — поперечный срез ранней нейрулы; Б — поперечный срез средней нейрулы; 1 — нервная пластинка; 2 — нервный желобок; 3 — мезодерма будущих сомитов; 4 — латеральная пластинка мезодермы; 5 — хорда; 6 — эктодерма; 7 — энтодерма; 8 — гастроцель; 9 — рудимент blastoцеля

тив $\times 40$), рассмотрите дорсальную область зародыша. Обратите внимание на строение нервной пластинки и форму клеток в различных ее слоях.

Рассмотрите дорсальную мезодерму. Найдите зачаток хорды и формирующиеся сомиты. Зарисуйте этот участок отдельно или прорисуйте увиденные элементы строения на общем рисунке зародыша.

На срезе можно видеть начало формирования нервной пластинки. В результате латеромедиальной миграции клеток гипоектодермы эктодерма на дорсальной стороне зародыша утолщается. В слое мезодермы в центре на дорсальной стороне выделяется закладка хорды (8 — 10 клеток). Гастральная полость выстлана клетками энтодермы, которые легко отличить от клеток мезодермы по крупным гранулам желтка. Небольшая полость внутри энтодермы — смещенный на вентральную сторону зародыша blastoцель.

Препарат № 2. Поперечный срез зародыша шпорцевой лягушки на стадии средней нейрулы

Задание. Рассмотрите при малом увеличении (объектив $\times 8$) и зарисуйте срез средней нейрулы (рис. 40, Б). Укажите на рисунке расположение дорсальной и вентральной сторон зародыша. Определите границы всех трех зародышевых листков. Найдите гастроцель, нервную пластинку, дорсальную сомитную мезодерму, пластинку латеральной мезодермы и закладку хорды. Потом переведите микроскоп на большое увеличение (объектив $\times 40$), рассмотрите дорсальную область зародыша. Обратите внимание на строение нервной пластинки и форму клеток в различных ее слоях. Обратите внимание на форму клеток в формирующихся сомитах. Зарисуйте этот участок отдельно или прорисуйте увиденные элементы строения на общем рисунке зародыша.

Клетки центральной области нервной пластинки вытягиваются и проникают между клетками гипоектодермы. Апоикальные поверхности клеток сокращаются. В нервной пластинке образуется продольный желобок. Клетки слоя мезодермы также смещаются на дорсальную сторону. Выделяется мезодерма будущих сомитов, клетки которой сильно вытягиваются. Отчетливо виден тяж хорды. В хорде и сомитной мезодерме продолжают движения конвергентного растяжения. Латеральная пластинка мезодермы представлена двумя слоями клеток — висцеральным и париетальным листками. Полость blastoцеля в энтодерме на вентральной стороне зародыша редуцируется.

Препарат № 3. Поперечный срез зародыша шпорцевой лягушки на стадии поздней нейрулы

Задание. Рассмотрите при малом увеличении (объектив $\times 8$) и зарисуйте сагиттальный срез поздней нейрулы (рис. 41, А). Укажите на рисунке расположение дорсальной и вентральной сторон зародыша. Определите границы всех трех зародышевых листков. Найдите гастроцель, нервную трубку, сомиты, пластинку латеральной мезодермы и закладку хорды. Потом переведите микроскоп на большое увеличение (объектив $\times 40$), рассмотрите клеточное строение всех перечисленных выше структур. Найдите скопление клеток нервного гребня между покровной эктодермой и нервной трубкой или чуть сбоку от нее. Сравните количество клеток хорды на срезах средней и поздней нейрулы.

Поперечный срез поздней нейрулы. Нервная пластинка замкнулась в нервную трубку с невроцелем внутри. Эктодерма образовала сплошной двуслойный пласт. Между нервной трубкой и эктодермой можно видеть тяж клеток нервного гребня. В хорде продолжаются конвергентная интеркаляция и растяжение вдоль оси зародыша. В мезодерме идет формирование сомитов. На срезе виден сомит в фазе ориентации его клеток перпендикулярно оси зародыша. Пластинка латеральной мезодермы двуслойная. Блесточель редуцирован.

Препарат № 4. Парасагиттальный срез зародыша шпорцевой лягушки на стадии поздней нейрулы

Задание. Рассмотрите при малом увеличении (объектив $\times 8$) и зарисуйте парасагиттальный срез поздней нейрулы (рис. 41, Б). Укажите на рисунке расположение дорсальной и вентральной сторон зародыша, а также переднего и заднего концов тела. Определите границы эктодермы, мезодермы и энтодермы. Найдите гастроцель, сомиты, несегментированную мезодерму в хвостовом отделе зародыша. Потом переведите микроскоп на большое увеличение (объектив $\times 40$), рассмотрите клеточное строение всех перечисленных выше структур. Прорисуйте увиденные элементы строения на общем рисунке зародыша.

Парасагиттальный срез поздней нейрулы. Срез прошел через осевую мезодерму, где можно видеть зоны формирования сомитов (см. рис. 39). Головной отдел зародыша справа. В хвостовой части располагается несегментированная мезодерма, ее клетки не ориентированы. Затем клетки эпителизуются, образуется пресомит, клетки которого вытягиваются в направлении, перпенди-

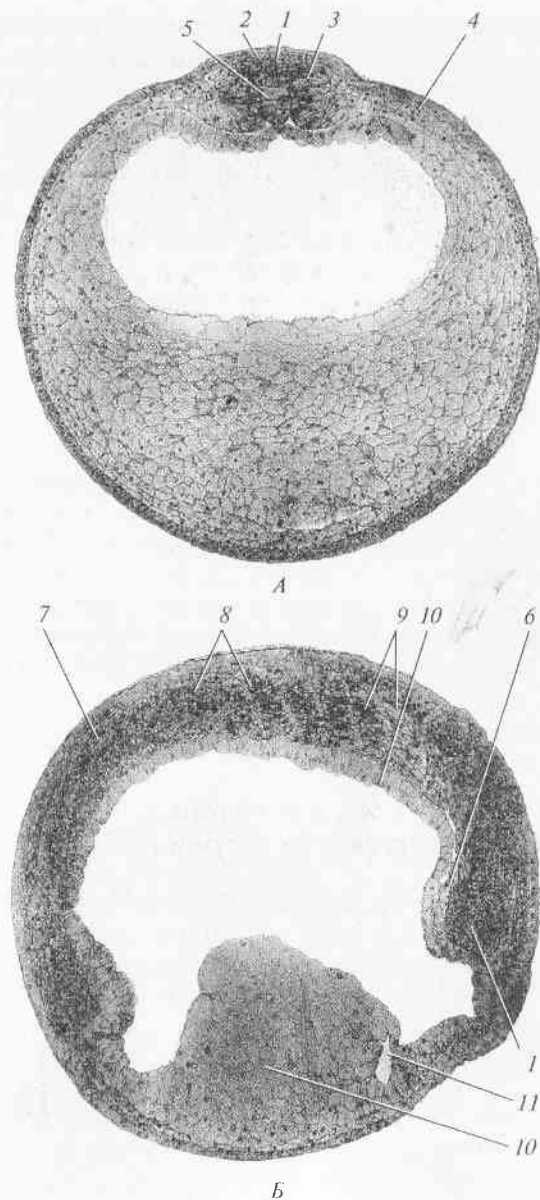
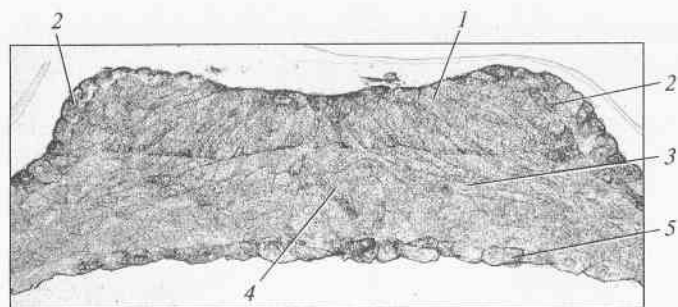
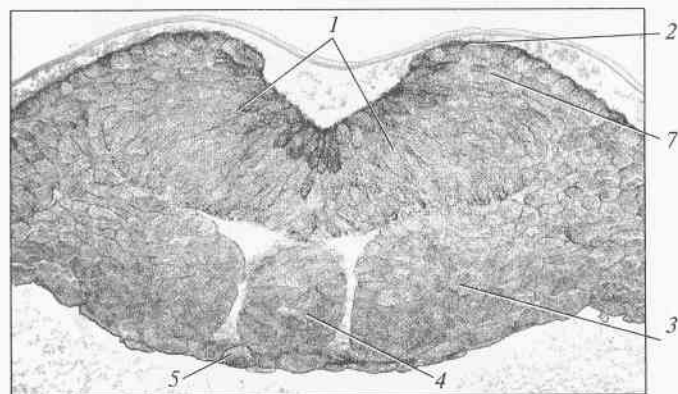


Рис. 41. Зародыш шпорцевой лягушки (*Xenopus laevis*) на стадии поздней нейрулы:

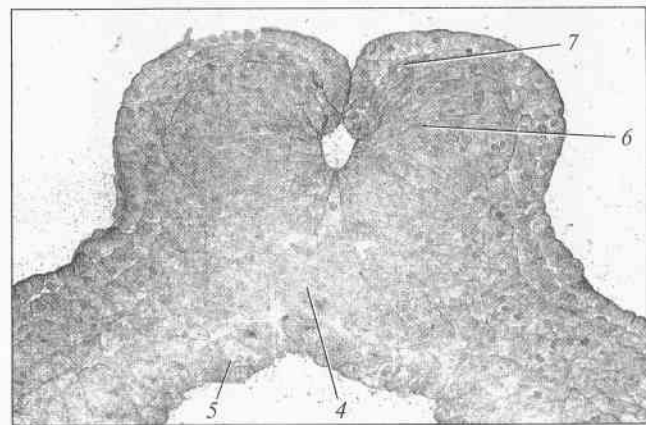
А — поперечный срез; Б — парасагиттальный срез; 1 — нервная трубка; 2 — нервный гребень; 3 — сомит; 4 — латеральная пластинка; 5 — хорда; 6 — прехордальная пластинка; 7 — несегментированная мезодерма; 8 — сомиты в процессе формирования; 9 — зрелый сомит; 10 — энтодерма; 11 — рудимент blastocoela



A



B



B

Рис. 42. Дорсальная сторона зародышей лягушки (*Rana temporaria*) в процессе нейруляции на поперечных срезах:

A — ранняя нейрула; Б — средняя нейрула; В — поздняя нейрула; 1 — нервная пластинка; 2 — нервные валики; 3 — мезодерма будущих сомитов; 4 — хорда; 5 — энтодерма; 6 — нервная трубка; 7 — клетки нервного гребня

кулярном оси зародыша (и плоскости рисунка). Далее клетки меняют ориентацию на продольную — формируется зрелый сомит. В головном отделе зрелых сомитов нет, имеется тонкая прехордальная пластинка и мезенхима головы. Гастральная полость выстлана энтодермой. В головной части виден глоточный вырост. Блостоцель редуцирован до маленькой полости на границе головного и туловищного отделов. Здесь будет формироваться сердце.

Для проведения занятия могут быть использованы препараты гаструл бесхвостых амфибий, например травяной лягушки — *Rana temporaria* (рис. 42).

РАННЕЕ РАЗВИТИЕ И ГАСТРУЛЯЦИЯ У ПТИЦ

Это и последующие занятия посвящены развитию амниот, у которых, в отличие от анамний, эмбрион развивается в окружении плодных оболочек.

Строение куриного яйца

Эмбриональное развитие птиц происходит под защитой яйцевых оболочек: белковой, подскорлуповых, скорлупы и надскорлуповой, а также внезародышевых оболочек: амниона и серозы. Яйцеклетка является многожелтковой (полилецитальной) с полярным (телолецитальным) распределением желтка.

После овуляции и оплодотворения в верхних отделах яйцевода начинается процесс дробления. Одновременно с этим на поверхность желточной оболочки железами яйцевода и «матки» (так условно называют нижний предклоачный отдел яйцевода) последовательно выделяются дополнительные (третичные) оболочки: белковая, подскорлуповые и скорлупа, а в клоаке — еще и надскорлуповая оболочка — тонкая белковая пленка, закрывающая поры скорлупы (рис. 43). Благодаря вращательным движениям яйца при прохождении его по яйцеводу часть белка закручивается в спиральные тяжи — халазы (рис. 44). Полное развитие зародыша в яйце проходит в течение трех недель при температуре 38—39°C.

Дробление

Самые ранние стадии развития птиц (дробление и формирование бластулы) проходят при движении яйца вниз по яйцеводу. За это время яйцо одевается третичными оболочками. Период дробления куриного зародыша составляет приблизительно 22 ч. Дробление зиготы у птиц неполное (меробластическое), дискоидальное. Желтка в ооцитах птиц еще больше, чем у костистых рыб, и в ходе дробления бластомеры образуются только в области свободной от желтка цитоплазмы на анимальном полюсе эмбриона.

Как и во всех других случаях дробления, расположение веретена деления отвечает правилу Гертвига — Сакса (веретено деления дроб-

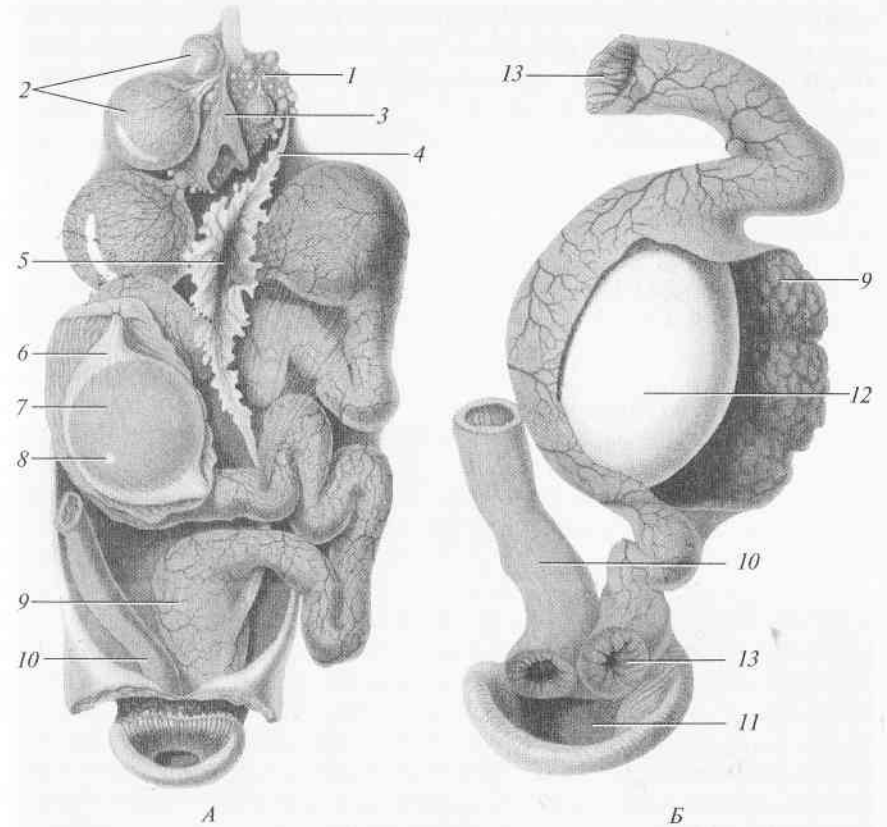


Рис. 43. Половая система курицы:

А — общий вид; Б — каудальная часть яйцевода; 1 — яичник; 2 — овулирующие ооциты; 3 — пустой фолликул после выхода яйца в яйцевод; 4 — верхняя часть воронки яйцевода; 5 — вход в яйцевод; 6 — белок, обволакивающий яйцеклетку; 7 — яйцо в яйцевод; 8 — зародышевый диск; 9 — «матка» (задняя часть яйцевода, где яйцо одевается скорлупой); 10 — прямая кишка; 11 — клоака; 12 — яйцо, одетое скорлупой; 13 — разрез яйцевода

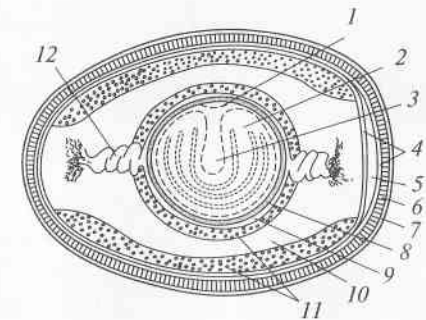


Рис. 44. Строение куриного яйца:

1 — зародышевый диск; 2 — желток; 3 — латера Пуркинье; 4 — подскорлуповые оболочки; 5 — пуга; 6 — скорлупа; 7 — надскорлуповая оболочка; 8 — желточная оболочка; 9 — халазообразующий плотный белок; 10 — плотный белок; 11 — жидкий белок; 12 — халаза

ления располагается по наибольшей протяженности свободной от желтка цитоплазмы). В результате в ходе первых 5—6 делений формируется однослойный зародышевый диск, все клетки которого открыты в желток (рис. 45, А). На 8—9-м делении происходит поворот веретен, и борозды этих делений располагаются широтно, формируя двухслойную структуру. В конце дробления образуется плоский многослойный зародыш — дискобластула, примерно 3—4 мм в диаметре (рис. 45, Б). Центральные клетки зародыша в ходе дробления теряют связь с желтком. В этом месте образуется подзародышевая полость. Краевые клетки бластодермы сохраняют тесную связь с желтком (рис. 45, В). На тотальных препаратах зародышей первых

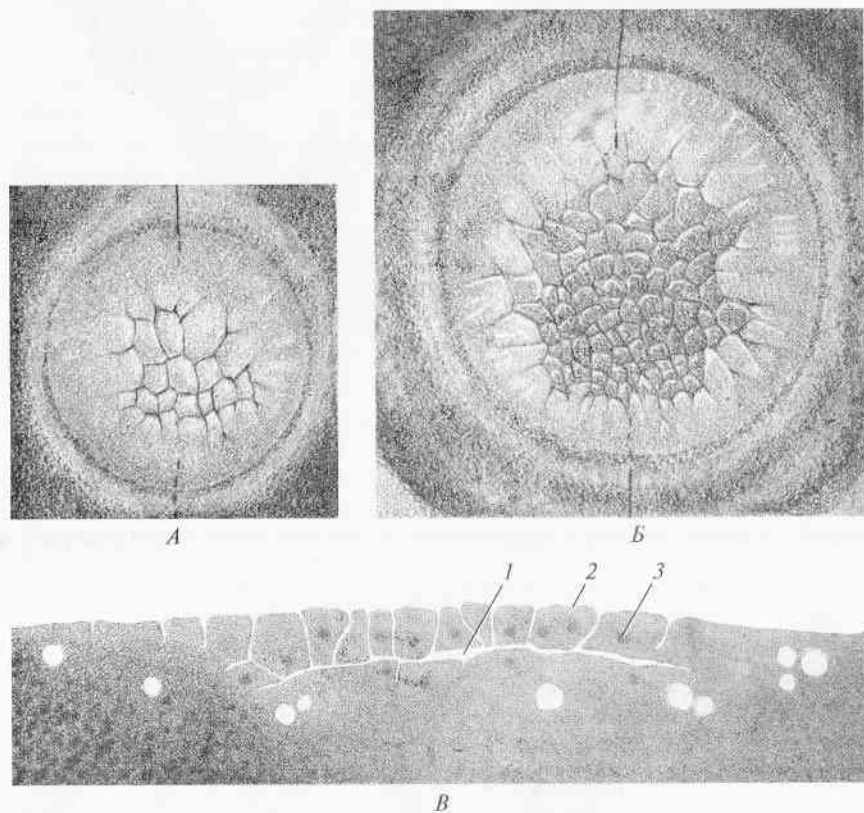


Рис. 45. Ранние стадии дробления куриного зародыша:

А — бластодиск после 5—6 делений дробления (яйцо находится в верхней части «матки»); Б — бластодиск после 7—8 делений дробления (яйцо находится в средней части «матки»); В — поперечный срез через бластодиск (по пунктирной линии, указанной на рис. Б); 1 — подзародышевая полость; 2 — бластомер; 3 — ядро

часов инкубации легко различить эти зоны: центральную светлую зону (*area pellucida*) и краевую темную зону (*area opaca*).

Гастрюляция

В начале инкубации (или насиживания) продолжается процесс гастрюляции, начавшийся еще в нижних отделах половых путей курицы.

В ходе этого первого этапа гастрюляции бластодерма разделяется на два пласта: верхний многослойный (*эпибласт*) и нижний однослойный (*первичный гипобласт*). Между ними располагается щелевидная полость — *бластоцель* (рис. 46).

С самого начала развития зародышевый диск расположен на желтке не горизонтально — один конец всегда находится выше другого. Это уже на самых ранних стадиях развития определяет положение передне-задней оси зародыша. Головной конец всегда располагается на том конце зародышевого диска, который расположен на желтке ниже. В эпибласте на заднем конце зародышевого диска образуется клеточное скопление серповидной формы — так называемый *серп Коллара*. Клетки серпа Коллара выселяются из эпибласта и продвигаются вперед, отодвигая клетки первичного гипобласта к краевой области зародышевого диска, — формируется *вторичный гипобласт*, который при дальнейшем развитии войдет в состав внезародышевой энтодермы.

Прежде чем приступить к изучению сложных формообразовательных (морфогенетических) движений отдельных клеток и клеточных пластов, следует рассмотреть карту презумптивных зачатков в эпибласте куриного зародыша (рис. 47). Направления основных перемещений клеток в эпибласте указаны на рис. 48, А. В результате значительная часть клеток эпибласта концентрируется в задней области светлой зоны. Это скопление клеток получило на-

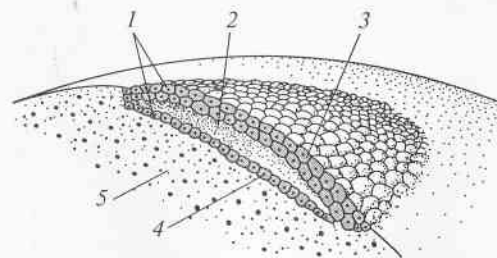


Рис. 46. Схематичный разрез куриного зародыша, находящегося на первом этапе гастрюляции (до начала инкубации):

1 — бластодерма; 2 — бластоцель; 3 — эпибласт; 4 — гипобласт; 5 — желток

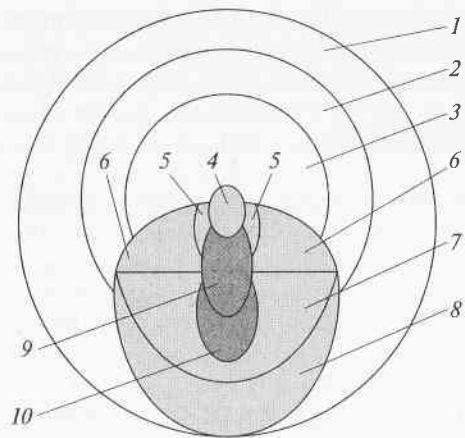
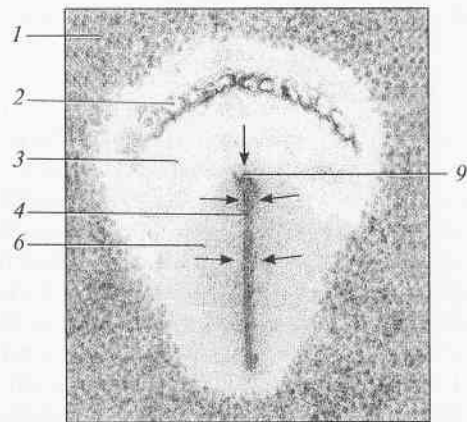
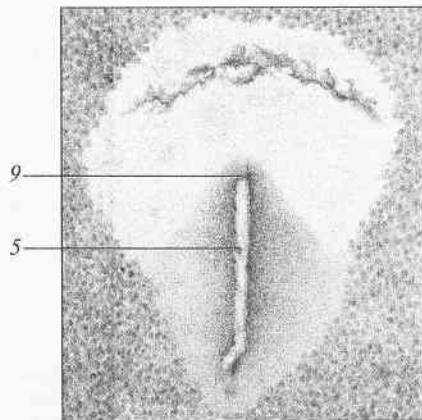


Рис. 47. Карта презумптивных зачатков куриного зародыша (вид на эпибласт сверху):

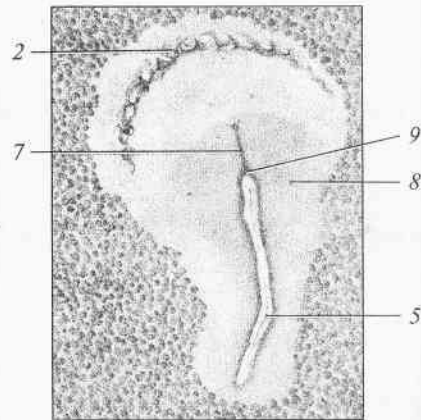
1 — внезародышевая эктодерма; 2 — зародышевая эктодерма; 3 — нервная пластинка; 4 — хорда; 5 — головная мезодерма; 6 — осевая (сомитная) мезодерма; 7 — боковая мезодерма; 8 — внезародышевая мезодерма; 9 — зародышевая (кишечная) энтодерма; 10 — энтодерма стенки желточного мешка



A



Б



В

звание первичной полоски. На первом этапе гаструляции первичная полоска удлиняется в краниальном направлении за счет дальнейшей миграции клеток эпибласта к центральной оси зародыша. На конце полностью сформированной первичной полоски образуется структура примерно из 20 крупных клеток столбчатой формы — *гензеновский узелок*.

Второй этап гаструляции заключается в выселении клеток из первичной полоски в полость бластоцеля. Миграция клеток из первичной полости очень активна (рис. 49), и клетки, продолжающие мигрировать в эпибласте к центральной оси зародыша, не могут восполнить их убыль. В результате по центральной оси первичной полоски появляется продольное углубление — первичная бороздка (рис. 49, Б). При дальнейшем выселении клеток из первичной полоски ее материал расходуется и происходит регрессия первичной полоски. Длина ее уменьшается, и гензеновский узелок сдвигается в каудальном направлении до тех пор, пока весь клеточный материал первичной полоски не будет израсходован.

Выселение клеток из первичной полоски идет через гензеновский узелок и через ее боковые стороны. Клетки, выселившиеся в полость бластоцеля через гензеновский узелок, формируют *хордальный вырост*. Клетки, выселяющиеся из передней части первичной полоски, присоединяются к вторичному гипобласту, формируя зародышевую (кишечную) *энтодерму*. В результате клетки гипобласта оказываются оттесненными на периферию зародышевого диска и участвуют только в формировании внезародышевой энтодермы (энтодермы желточного мешка). Клетки, выселяющиеся через боковые стороны первичной полоски, формируют латеральную мезодерму зародыша и внезародышевую мезодерму.

При сравнении процессов гаструляции у птиц и амфибий становится очевидным, что гензеновский узелок аналогичен дорсальной губе бластопора у амфибий, а стороны первичной полоски — боковым губам бластопора.

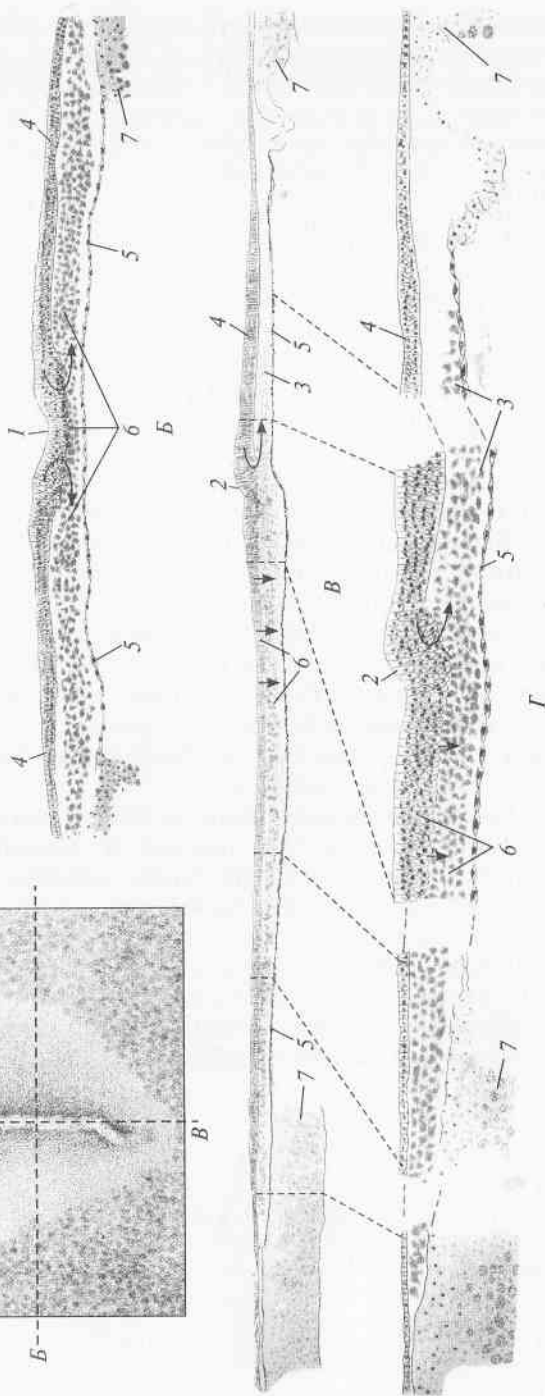
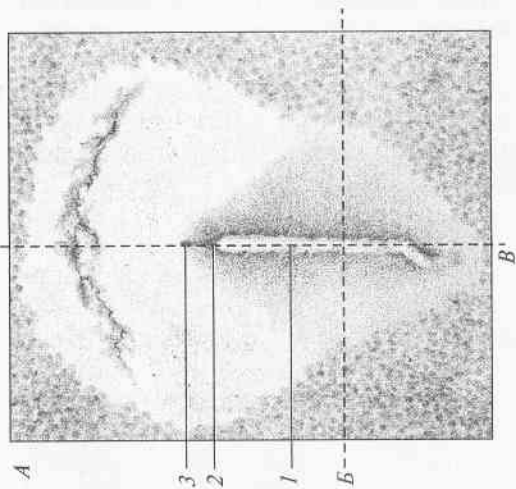
Одновременно с процессом гаструляции увеличивается диаметр зародышевого диска за счет разрастания края эпибласта по поверхности желтка (эпиболия).

Рис. 48. Зародыш курицы во время гаструляции (вид на зародышевый диск сверху):

A — 15 ч инкубации (стадия первичной полоски); Б — 16 ч инкубации (стадия первичной бороздки); В — 19 ч инкубации (начало формирования хордального выроста); 1 — темная зона (*area opaca*); 2 — проамнион; 3 — светлая зона (*area pellucida*); 4 — первичная полоска; 5 — первичная бороздка; 6 — клетки, движущиеся к первичной полоске (более темная область зародышевого диска), направление движения показано стрелками; 7 — хордальный вырост; 8 — клетки мезодермы, мигрирующие под эпибласт из первичной бороздки (более темная область зародышевого диска); 9 — гензеновский узелок

Рис. 49. Строение зародыша курицы на втором этапе гастрюляции.

А — 19 ч инкубации, вид на зародышевый диск сверху (начало формирования хордального выроста); В — поперечный срез первичной полоски (уровень среза показан пунктирной линией на рис. А); В — сагиттальный срез зародыша на стадии хордального выроста, общий вид при малом увеличении (направление среза показано вертикальной пунктирной линией на рис. А); Г — сагиттальный срез зародыша на стадии хордального выроста (при большом увеличении). Стрелками показано направление миграции клеток через первичную полосу (В) и гензенновский узелок (В, Г); 1 — первичная бороздка; 2 — гензенновский узелок; 3 — хордальный вырост; 4 — эктодерма; 5 — энтодерма; 6 — мезодерма; 7 — желток



Препараты к занятию «Раннее развитие и гастрюляция птиц»

На занятиях, посвященных развитию птиц, предлагаем рассмотреть два типа препаратов: тотальные препараты куриных зародышей и соответствующие этой стадии развития гистологические срезы. Изучение поперечных и сагиттальных срезов первичной бороздки дает наглядное представление о перераспределении клеточных масс в ходе гастрюляции, а тотальные препараты зародышевого диска — об общем плане строения эмбриона.

Препарат № 1. Стадия первичной полоски (эмбрион курицы на стадии до 15 ч инкубации): тотальный препарат

Задание. При малом увеличении микроскопа (объектив $\times 8$) рассмотрите и зарисуйте тотальный препарат зародышевого диска курицы на стадии первичной полоски (см. рис. 48, А) или первичной бороздки (см. рис. 48, В) (по выбору преподавателя). На рисунке обозначьте *area pellucida* и *area opaca*, а также передний и задний концы зародыша. Крупные темные гранулы в области *area opaca* — это желточные гранулы, затемненные области в *area pellucida* — скопление клеток, мигрирующих в область первичной полоски.

Стадия первичной полоски. На тотальных препаратах зародышей на стадии 6—13 ч инкубации в задней части светлой зоны четко выделяется область скопившихся клеток — первичная полоска. По мере постоянно увеличивающегося количества клеток в первичной полоске она удлиняется в задне-переднем направлении и скоро достигает центра светлой зоны. В соответствии с картой презумптивных зачатков легко определить, что массу клеток первичной полоски составляют будущая мезодерма и хорда, а также клетки будущей зародышевой и внезародышевой энтодермы. Первыми из первичной полоски выселяются в бластоцель клетки внезародышевой энтодермы (вторичный гипобласт). Клетки вторичного гипобласта встраиваются в первичный гипобласт. Первичный и вторичный гипобласты позже образуют внезародышевую энтодерму (выстилку желточного мешка).

Стадия первичной бороздки. По мере накопления клеток первичная полоска зародышей на стадии 18—19 ч инкубации приобретает продольное углубление по средней линии с валиками по краям, а также углубление в передней ее части — первичная ямка (гензенновский узелок). На тотальных препаратах эти структуры хорошо видны.

К этому времени начинается иммиграция клеток зародышевой энтодермы (энтобласт) под эпибласт из передней части первичной полоски. Эти клетки движутся в бластоцеле вперед от гензеновского узелка, замещая (встраиваясь) собой гипобласт в переднем отделе зародыша. Клетки энтобласта формируют выстилку кишки.

Препарат № 2. Стадия хордального выроста (эмбрион курицы на стадии 18—20 ч инкубации): тотальный препарат

Задание. При малом увеличении микроскопа (объектив $\times 8$) рассмотрите и зарисуйте тотальный препарат зародышевого диска курицы на стадии хордального выроста (см. рис. 48, В). На рисунке обозначьте *area pellucida* и *area opaca*, а также передний и задний конец зародыша.

Стадия хордального выроста. На этом этапе помимо формирования энтобласта происходит также выселение клеток мезодермы (мезобласт) через гензеновский узелок и через стенки (валики) первичной бороздки. При этом клетки, иммигрирующие через гензеновский узелок в переднем направлении, образуют хордальный вырост — головной отросток (будущая хорда) и головную мезодерму.

С этого момента начинается регрессия первичной бороздки. Она начинает укорачиваться в передне-заднем направлении, и гензеновский узелок начинает смещаться из центра светлой зоны к ее заднему краю, оставляя на своем пути клетки, нарастающие сзади хордальный вырост. На тотальном препарате зародыша хорошо виден хордальный вырост, расположенный спереди от гензеновского узелка. Затемненные области справа и слева от него — скопления клеток головной мезодермы. Затемненные области справа и слева от первичной полоски — скопления выселяющихся мезодермальных клеток (осевая и боковая мезодермы зародыша, а также внезародышевая мезодерма).

Препарат № 3. Стадия хордального выроста (эмбрион курицы на стадии 18—20 ч инкубации): поперечный срез

Задание. При малом увеличении микроскопа (объектив $\times 8$) (см. рис. 49, Б) найдите на препарате срез зародышевого диска. Прежде чем начать рисунок, определите на срезе дорсальную и вентральную стороны (на периферии зародышевого диска с вентраль-

ной стороны видны гранулы желтка). Найдите на срезе область первичной полоски, переведите микроскоп на большое увеличение (объектив $\times 40$) и зарисуйте препарат.

На поперечных срезах в области первичной полоски хорошо видны валики с углублением (первичной бороздкой) между ними — это область выселения мезодермальных клеток. Справа и слева от валиков располагаются более тонкие пласты эктодермы. Под верхним слоем размещается слой выселяющихся из первичной бороздки рыхлых мезодермальных клеток. Самый нижний слой — энтодерма. Для правильной ориентации срезов при просмотре гистологических препаратов куриных зародышей ранних стадий развития следует обращать внимание на расположение гранул желтка на краях среза: они должны быть направлены вниз (см. рис. 49). При такой ориентации спинная сторона зародыша будет наверху, а брюшная — внизу.

Препарат № 4. Стадия хордального выроста (эмбрион курицы на стадии 18—20 ч инкубации): сагиттальный срез

Задание. При малом увеличении микроскопа (объектив $\times 8$) (см. рис. 49, В) найдите на препарате срез зародышевого диска, переведите микроскоп на большое увеличение (объектив $\times 40$) (см. рис. 49, Г) и зарисуйте препарат.

Прежде чем начать рисунок, определите на срезе передний и задний концы зародыша, а также дорсальную и вентральную стороны.

На сагиттальном срезе зародыша хорошо видны клетки гензеновского узелка и направляющиеся в головной отдел зародыша — клетки хорды (хордальный вырост). Над этими клетками расположен пласт эктодермы. Подстилает хордальный вырост тонкий слой энтодермы (энтобласт). В области первичной бороздки различимы три слоя клеток: мощный верхний пласт составляют мезодермальные клетки, скопившиеся в валиках первичной бороздки; тонкий нижний слой — энтодерма; между ними располагается рыхлый слой мезодермальных клеток, выселяющихся из валиков первичной бороздки. В некоторых случаях энтодерма хорошо видна только в периферической области среза (один слой веретеновидных клеток), а в зоне первичной полоски, где идет активное выселение клеток, ее труднее отличить (по форме и размеру клеток) от лежащей выше мезодермы.

НЕЙРУЛЯЦИЯ У ПТИЦ

Процесс формирования нейральных структур у птиц и других классов позвоночных во многом сходен. Более подробно данный процесс был рассмотрен в занятии № 6 на примере нейруляции у амфибий. Это же занятие будет посвящено в основном тому, как устанавливается основной план строения позвоночного животного и как зародышевые листки разделяются на зародышевую (эмбриональную) и внезародышевую области.

В ходе эмбрионального развития птиц, помимо образования собственно тела зародыша, формируются так называемые внезародышевые органы — амнион, сероза, желточный мешок и аллантоис. Разделение зародышевых листков на собственно зародышевые и внезародышевые начинается на стадии нейрулы. На этом этапе развития в области головного отдела зародыша в связи с его активным ростом в задне-переднем направлении образуется складка, названная *туловищной*, поскольку в дальнейшем она отделит туловище зародыша от желтка со всех сторон (цв. вкл. IV, А, Б). Связь зародыша с внезародышевыми органами сохранится только в одном месте — на брюшной стороне зародыша в виде *желточного стебелька* (цв. вкл. IV, Г). Часть туловищной складки в переднем отделе зародыша называется *головной складкой*, в заднем отделе — *хвостовой*, а в боковых отделах зародыша — *боковой*. Головная складка закладывается раньше остальных. Она состоит из тонких пластов эктодермы и энтодермы. Мезодерма, движущаяся к головному отделу зародыша из области первичной бороздки, к этому моменту еще не достигла области, расположенной перед головой зародыша (цв. вкл. IV, А). Важно отметить, что в ходе образования туловищной (головной) складки в головном отделе зародыша образуется полость — *головная кишка*, дающая начало образованию кишки у зародышей птиц. Таким же образом с помощью хвостовой складки формируется *задняя кишка*. Боковые складки, являясь продолжением головной складки, формируют боковые отделы кишечной трубки. Кишка у птиц с начала ее формирования полностью выстлана энтодермой.

Зародышевые листки, продолжая дифференцироваться в ходе нейруляции, образуют органы осевого комплекса: нервную трубку, хорду, сомиты. Из мезодермы *боковой пластинки* путем расщепления образуются *париетальный* (наружный) и *висцеральный*

(внутренний) листки мезодермы, между которыми располагается полость — *целом* (цв. вкл. IV, Г, Д).

В это же время за пределами зародыша происходит обрастание желтка внезародышевыми листками эктодермы, мезодермы и энтодермы, что в дальнейшем приводит к образованию желточного мешка. Край клеточной массы, движущийся по желтку, называется *краем обрастания* (цв. вкл. IV, Б, В). Краевые клетки внезародышевой эктодермы в своем движении опережают клетки внезародышевого энтодермального слоя. От этих слоев значительно отстает слой внезародышевой мезодермы в связи с более поздним формированием его в ходе гастрюляции. При этом в области *area opaca* образуются многочисленные скопления клеток внезародышевой мезодермы — *кровяные островки*. Вскоре в каждом скоплении появляется полость, и они приобретают строение пузырьков. В результате слияния пузырьков друг с другом возникают сосуды, которые, соединяясь между собой, постепенно формируют в стенке желточного мешка кровеносную систему — *сосудистое поле желточного мешка*.

Препараты к занятию «Нейруляция у птиц»

Приступая к изучению строения зародыша на стадии нейрулы, следует обратить внимание на то, что дифференцировка зародышевых листков в головном отделе зародыша значительно опережает дифференцировку в туловищном и хвостовом отделах. Так, смыкание нервных валиков начинается с головного отдела, а затем распространяется в заднем направлении. Так же происходит сегментация осевой мезодермы при образовании сомитов. С головного отдела начинается отделение зародыша от желтка (рис. 50). Это явление называют *краниокаудальным градиентом развития*. Он характерен для эмбрионов всех классов позвоночных животных, у птиц выражен особенно ярко, так как в период гастрюляции и нейруляции тело эмбриона существенно вырастает за счет постоянного поступления мезодермальных клеток из первичной бороздки и его размеры по краниокаудальной оси на порядок превышают поперечные размеры. На препаратах поздней нейрулы курицы видно, что в хвостовой области зародышевого диска присутствует участок, на котором еще завершается гастрюляция. В центральной части зародышевого диска хорошо заметны структуры, характерные для ранней (нервная пластинка) и средней (нервные валики) нейрулы.

Изучение строения зародышей в ходе процесса нейруляции следует начинать с тотальных препаратов. Для более детального изучения строения зародышей на стадии нейрулы следует использовать поперечные и сагиттальные срезы зародышей на стадиях

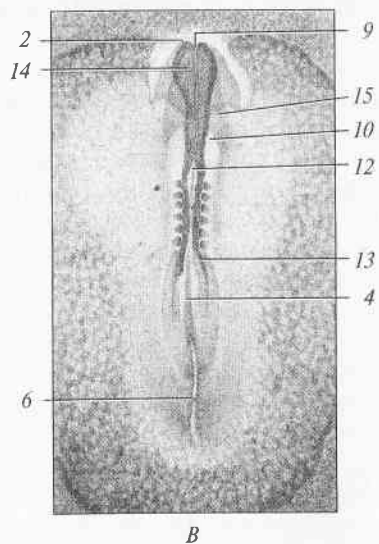
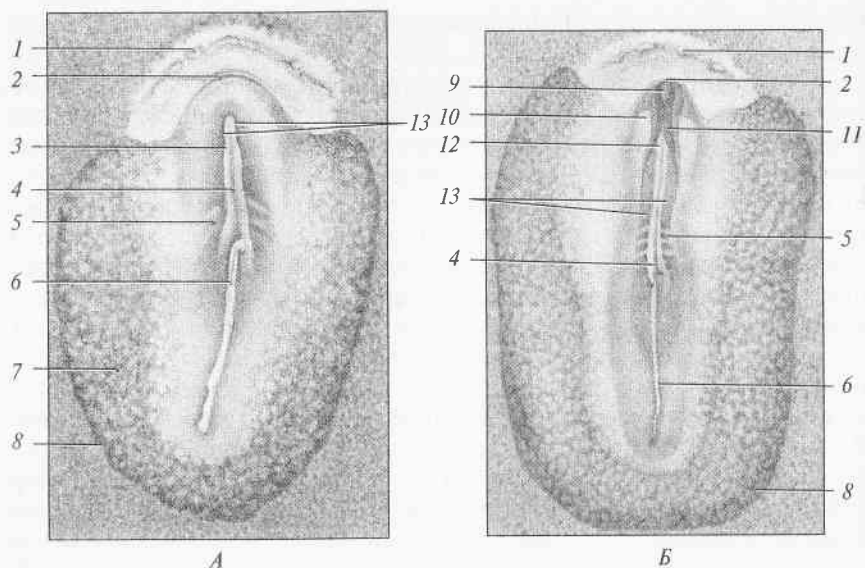


Рис. 50. Тотальные препараты зародыша курицы на разных стадиях:

А — ранняя нейрула (23—24 ч инкубации); Б — средняя нейрула (24—26 ч инкубации); В — поздняя нейрула (26—28 ч инкубации); 1 — проамнион; 2 — передний конец головы зародыша (место закладки передней части туловищной складки); 3 — нервная пластинка; 4 — хорда; 5 — сомиты; 6 — первичная бороздка; 7 — кровяные островки; 8 — край обрастания; 9 — передний невропор; 10 — передние кишечные ворота; 11 — место смыкания нервных валиков; 12 — задний невропор; 13 — нервные валики; 14 — передний мозговой пузырь; 15 — головная кишка

ранней, средней и поздней нейрулы. На поперечных срезах зародышей хорошо видны преобразования, происходящие в эктодерме, мезодерме и энтодерме в ходе нейруляции. Однако, пользуясь тем, что дифференцировка зародышевых листков в ходе нейруляции в головном отделе значительно опережает дифференцировку в туловищном и хвостовом отделах, можно рассмотреть поперечные срезы зародышей одной стадии развития, например поздней нейрулы. На срезах одного зародыша, сделанных на разных уровнях — головного отдела, на уровне прохождения туловищной складки и туловищного отдела, можно проследить последовательность изменений строения зародыша в ходе всей нейруляции.

Препарат № 1. Нейрула курицы: тотальный препарат

Задание. Под микроскопом при малом увеличении (объектив $\times 8$) или под бинокулярной лупой рассмотрите и зарисуйте эмбрион курицы на стадии нейрулы (ранней, средней или поздней — по выбору преподавателя). На рисунке укажите передний и задний конец эмбриона, подсчитайте и запишите количество пар сомитов. При зарисовке обратите внимание на расположение головной туловищной складки, переднего и заднего невропоров.

Ранняя нейрула (23—24 ч инкубации). На ранних этапах нейруляции следует обратить внимание на начало отделения головного отдела зародыша от стенки желточного мешка с помощью головной складки. На тотальных препаратах зародышей стадии ранней нейрулы эта складка представлена серповидной полоской спереди от нервных валиков, образующихся к этому времени в головном отделе зародыша. На этой стадии развития начинается сегментация осевой мезодермы: на препаратах хорошо видна первая пара сомитов (рис. 50, А).

Средняя нейрула (24—26 ч инкубации). На тотальных препаратах стадии средней нейрулы следует рассмотреть край головной складки, расположенной под головой зародыша. Это место называется *областью передних кишечных ворот*, так как здесь расположен вход в головную кишку зародыша. На этой стадии в теле зародыша имеется 4—5 пар сомитов, в задней области *area opaca* появляются кровяные островки, продолжают смыкаться нервные валики, образуя нервную трубку. Хорошо видны *невропоры* — открытые входы спереди и сзади, ведущие в полость нервной трубки — *невроцель* (рис. 50, Б).

Поздняя нейрула (26—28 ч инкубации). У зародышей стадии поздней нейрулы передний отдел нервной трубки расширен, имеется 6—8 пар сомитов, начинают объединяться парные зачатки сердца, продолжают смыкаться нервные валики (рис. 50, В). На

этой стадии развития особенно хорошо заметен краниокаудальный градиент в развитии. Каудальнее заднего невропора хорошо видны нервные валики и нейральная пластинка. В самой задней части *area pellucida* все еще продолжается процесс нейруляции. Здесь хорошо различимы хордальный вырост, гензеновский узелок и остаток первичной полоски.

Препарат № 2. Средняя нейрула курицы: поперечный срез в области головного отдела

Задание. Под микроскопом при малом увеличении (объектив $\times 8$) найдите срез нейрулы, переведите на большее увеличение ($\times 20$) и зарисуйте. На рисунке укажите расположение дорсальной и вентральной сторон эмбриона.

На срезах зародыша, сделанных *в области головного отдела* (рис. 51, Б), хорошо видно раздельное расположение головы и стенки желточного мешка. Стенку тела зародыша образует покровная эктодерма; нервная трубка погружена внутрь зародыша; в области смыкания нервных валиков расположен материал нервного гребня. Под нервной трубкой расположена хорда (в головной части хорда отсутствует). Мезодерма в полости головы представлена отдельными рыхло расположенными мезенхимными клетками. Кишечник замкнут. Стенка желточного мешка образована внезародышевыми эктодермой, мезодермой и энтодермой. В области подголовного кармана мезодермальные клетки стенки желточного мешка немногочисленны или отсутствуют. Их подрастание в эту область произойдет позже.

Препарат № 3. Средняя нейрула курицы: поперечный срез на уровне передних кишечных ворот

Задание. Под микроскопом при малом увеличении (объектив $\times 8$) найдите срез нейрулы, переведите на большее увеличение ($\times 20$) и зарисуйте. На рисунке укажите расположение дорсальной и вентральной сторон эмбриона.

На срезах зародышей *в области прохождения туловищной складки* (на уровне кишечных ворот) зародыш еще не отделен от желтка (см. рис. 51, В). О скором прохождении туловищной складки в этом отделе можно судить по форме изгибов зародышевых листков. Направление движения туловищной складки показано на рисунке стрелками. На этом уровне нервные валики почти сомкнуты. Под образующейся нервной трубкой располагается хорда. Осталь-

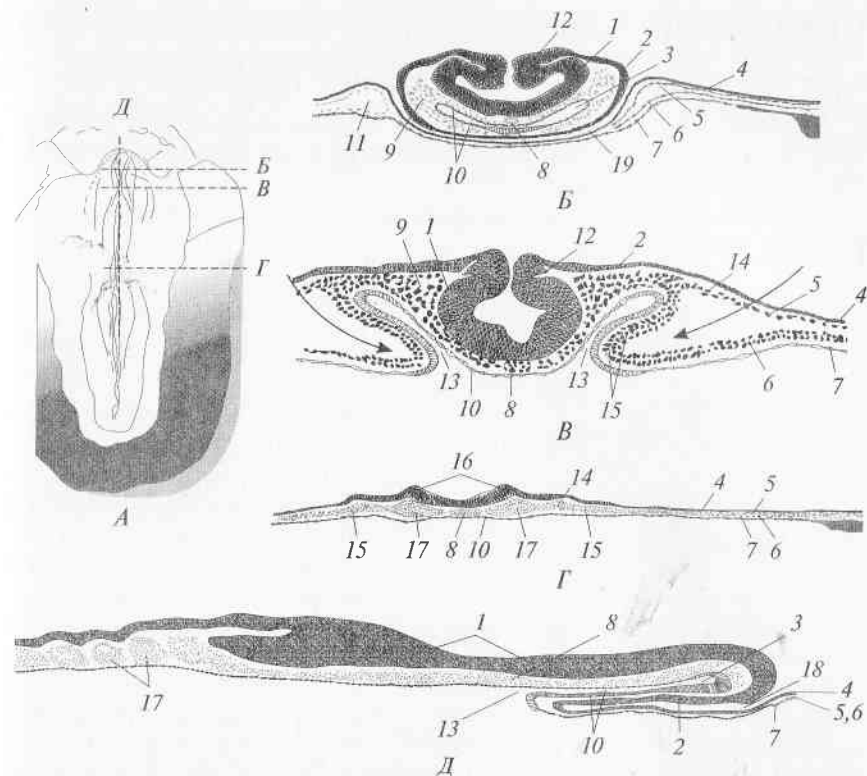


Рис. 51. Срезы зародыша курицы на стадии средней нейрулы:

А — схема, показывающая расположение уровней срезов Б—Д на зародышевом диске; Б — поперечный срез на уровне головного отдела (голова отделена от стенки желточного мешка); В — поперечный срез на уровне передних кишечных ворот; Г — поперечный срез на уровне туловищного отдела; Д — парасагиттальный срез; 1 — нервная трубка; 2 — эктодерма головы; 3 — головная кишка; 4 — внезародышевая эктодерма; 5 — внезародышевая мезодерма (париетальный листок); 6 — внезародышевая мезодерма (висцеральный листок); 7 — внезародышевая энтодерма; 8 — хорда; 9 — головная мезодерма; 10 — кишечная энтодерма; 11 — внезародышевый целом; 12 — нервный гребень; 13 — область передних кишечных ворот; 14 — париетальный листок латеральной мезодермы; 15 — висцеральный листок латеральной мезодермы; 16 — нервные валики; 17 — сомиты; 18 — головная часть туловищной складки

ная часть мезодермы представлена головной мезенхимой. На препарате хорошо видны париетальный и висцеральный листки латеральной мезодермы, разделенные целомом. Висцеральный листок мезодермы снизу подостлан тонким пластом энтодермальных клеток. Кишечник зародыша не замкнут, полное разделение энтодермы на зародышевую и внезародышевую в этой области еще не произошло.

Препарат № 4. Средняя нейрула курицы: поперечный срез в области туловищного отдела

Задание. Под микроскопом при малом увеличении (объектив $\times 8$) найдите срез нейрулы, переведите на большее увеличение ($\times 20$) и зарисуйте.

На рисунке укажите расположение дорсальной и вентральной стороны эмбриона.

На срезах зародышей в области туловищного отдела (рис. 51, Г) хорошо видно, что зародышевые листки находятся на более ранней стадии дифференцировки: нервная трубка не замкнута; осевая мезодерма в начале сегментации; в боковой мезодерме только начинается разделение на париетальный и висцеральный листки. Так как этот срез прошел через область, где уже сформированы сомиты, их можно видеть по бокам от хорды. Часто на препаратах сомит имеет характерную форму «розетки». Тонкий слой энтодермы отделяет зародыш от желтка.

Препарат № 5. Средняя нейрула курицы: сагиттальный срез

Задание. Под микроскопом при малом увеличении (объектив $\times 8$) найдите срез нейрулы, переведите на большое увеличение ($\times 40$) и зарисуйте. Прежде чем начать зарисовку, следует определить на препарате расположение дорсальной и вентральной сторон, а также переднего и заднего концов эмбриона (укажите их на рисунке). Обратите внимание, является ли этот срез центрально-сагиттальным (т.е. прошел по средней линии зародыша, и на препарате видны хорда, а в каудальной части — хордальный вырост, гензеновский узелок и первичная полоска) или парасагиттальным (т.е. прошел сбоку от средней линии зародыша, а на препарате видны сомиты).

На сагиттальных срезах наиболее наглядно видно образование головной кишки зародыша в ходе образования головной туловищной складки (на рисунке — справа); хорошо виден вход в головную кишку — передние кишечные ворота (рис. 51, Д). Эмбрион в результате фиксации может быть чуть изогнут (рис. 51, А). В данном случае в области головной туловищной складки срез прошел практически сагиттально: видно дно нервной трубки. Каудальнее области головной туловищной складки срез прошел парасагиттально: видны сомиты и боковая часть нервной трубки.

ЗАНЯТИЕ 9

НАЧАЛО ОРГАНОГЕНЕЗА У ПТИЦ

После образования в ходе гаструляции зародышевых листков начинается период органогенеза, в течение которого происходит дифференцировка эктодермы, мезодермы и энтодермы, приводящая к формированию органов и тканей зародыша. Строение зародыша усложняется, и для его подробного описания необходимо проведение специального курса, посвященного частной эмбриологии. В рамках пособия рассмотрим ключевые события этого периода развития. Основная цель этого и следующего занятий — получить представление об общем плане строения зародыша птиц в данный период развития.

Производные эктодермы. Начало дифференцировки эктодермы было рассмотрено на предыдущем занятии: выделение из наружного зародышевого листка нервной трубки с нервным гребнем и покровной эктодермы. После завершения нейруляции клетки нервного гребня мигрируют и дают начало черепным чувствительным ганглиям и нервам, ганглиям дорсальных корешков спинальных нервов, симпатическим ганглиям, шванновским клеткам, мозговому веществу надпочечников, меланоцитам. Кроме того, в головной области клетки нервного гребня мигрируют в жаберные дуги и участвуют в дальнейшем в формировании черепа и висцеральных хрящей и головной соединительной ткани.

Производные нервной трубки — центральная нервная система (головной и спинной мозг), органы чувств (нейральная часть органов зрения и слуха). Дифференцировка нервной трубки на головной и спинной мозг происходит одновременно с процессом нейруляции. Позже передний невропор закрывается, область головного мозга увеличивается в размере и подразделяется сначала на три мозговых пузыря (рис. 52, А): *prosencephalon* — первичный передний мозг; *mesencephalon* — средний мозг; *rhombencephalon* — первичный задний, а затем — на пять (рис. 52, Б), при этом *prosencephalon* преобразуется в передний (*telencephalon*) и промежуточный (*diencephalon*), а *rhombencephalon* — в задний (*metencephalon*) и продолговатый (*myelencephalon*), *mesencephalon* же остается без изменений.

В дальнейшем передний мозговой пузырь (*telencephalon* — передний мозг) интенсивно вытягивается вперед и за счет впячивания снаружи в глубь перепонки (пограничной мембраны) разделяется

на два отдела — зачатки двух полушарий мозга. При дифференцировке второго мозгового пузыря (*diensephalon* — *промежуточный мозг*) его боковые стенки выпячиваются, образуя так называемые глазные пузыри — зачатки нейральных частей глаз. На дорсальной стенке начинает развиваться эпифиз, а на вентральной — гипо-

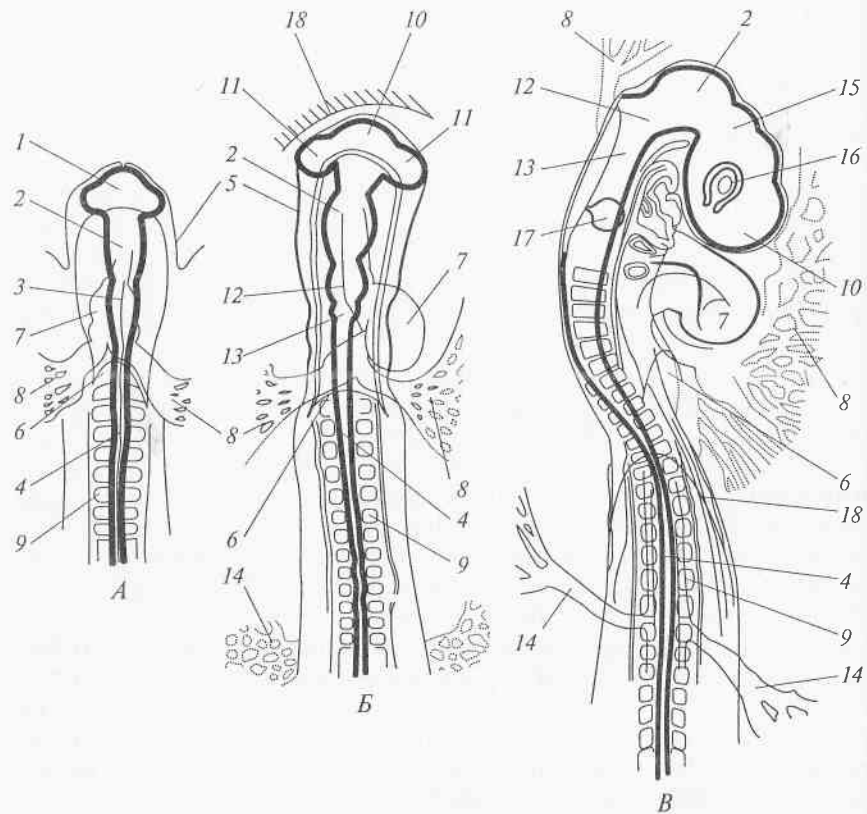
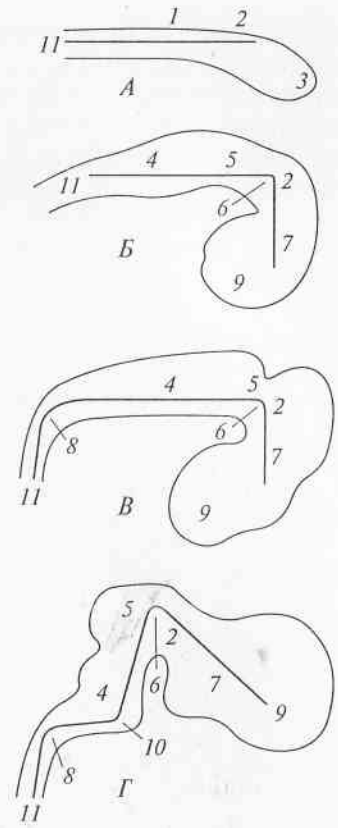


Рис. 52. Головной отдел зародыша цыпленка (вид с дорсальной стороны):

А — стадия трех мозговых пузырей (33—38 ч инкубации); Б — стадия пяти мозговых пузырей (45—49 ч инкубации); В — стадия поворота (51—56 ч инкубации); 1 — первичный передний мозговой пузырь (*prosencephalon*); 2 — средний мозговой пузырь (*mesencephalon*); 3 — первичный задний мозговой пузырь (*rhombencephalon*); 4 — спинной мозг; 5 — головная туловищная складка; 6 — передние кишечные ворота; 7 — закладка сердца; 8 — желточные вены; 9 — сомит; 10 — передний мозг (*telencephalon*); 11 — глазные пузыри (*diensephalon*, боковая часть); 12 — задний мозг (*metencephalon*); 13 — продолговатый мозг (*myelencephalon*); 14 — желточная артерия; 15 — промежуточный мозг (*diensephalon*); 16 — глазной бокал; 17 — слуховой пузырек (производное покровной эктодермы); 18 — край амниотической складки

Рис. 53. Формирование изгибов головного мозга у зародыша курицы (по Ч. Бодемеру, 1971):

А — стадии формирования головного мозга до образования изгибов (48 ч инкубации); Б — теменной изгиб в области среднего мозга (51—56 ч инкубации); В — затылочный изгиб (72 ч инкубации); Г — изгиб моста (8-е сутки инкубации); 1 — первичный задний мозг (*rhombencephalon*); 2 — средний мозг (*mesencephalon*); 3 — первичный передний мозг (*prosencephalon*); 4 — продолговатый мозг (*myelencephalon*); 5 — задний мозг (*metencephalon*); 6 — теменной изгиб; 7 — промежуточный мозг (*diensephalon*); 8 — затылочный изгиб; 9 — передний мозг (*telencephalon*); 10 — изгиб моста; 11 — спинной мозг



физ. На уровне среднего мозгового пузыря (*mesencephalon* — *средний мозг*), на стадии поворота происходит первый изгиб мозга (рис. 53; см. также рис. 52, В) и одновременно в его дорсальной части закладывается четверохолмие — зрительные и слуховые центры мозга. В четвертом мозговом пузыре (*metencephalon* — *задний мозг*) нижняя и боковые стенки вступают на путь развития мозжечка, а верхняя — варолиева моста. Пятый мозговой пузырь (*myelencephalon* — *продолговатый мозг*) преобразуется в это время таким образом, что боковые его стенки утолщаются в связи с дифференцировкой проводящих путей от передних отделов мозга в сторону спинного. Это приводит к растяжению дорсальной стенки, которая хорошо просвечивает на тотальных препаратах, так как данный отдел мозга находится в боковом положении.

Продолговатый мозг переходит в *спинной мозг*. На протяжении шейного отдела зародыша спинной мозг выравнивается в плоское положение на желточном мешке. Хорошо видны его плотные боковые стенки и узкий просвет полости сквозь тонкую дорсальную стенку. Задний невропор на протяжении третьих суток инкубации закрывается.

Производными эктодермы являются также *органы чувств* (зрения, обоняния и слуха). Зачатки глаз, заложенные в форме пузыревидных выпячиваний промежуточного мозга, увеличиваясь, соприкасаются с эктодермой головы и начинают преобразовываться в двухслойную *глазную чашу*. Внутренний слой чаши — зачаток *сетчатки*, наружный — *пигментного эпителия*, а ее край

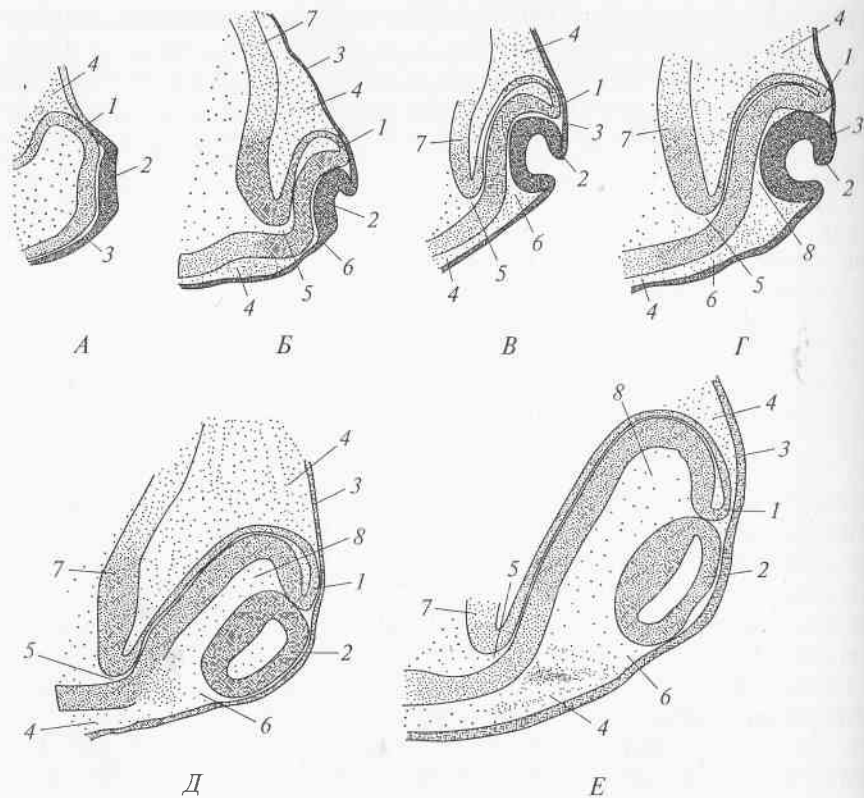


Рис. 54. Последовательные стадии развития глаза эмбриона курицы:

A — глазной пузырь (стадия 20 сомитов); *B* — глазной бокал (стадия 23 сомитов); *B* — стадия 27 сомитов; *Г* — стадия 30 сомитов; *Д* — стадия 32 сомитов; *Е* — стадия 39 сомитов; 1 — стенка глазного пузыря (*A*), а затем глазного бокала (*B–E*); 2 — презумптивная хрусталиковая эктодерма (*A*), хрусталиковая плакода (*B–Г*), хрусталиковый пузырек (*Д–E*); 3 — покровная эктодерма; 4 — мезенхима; 5 — глазной стебелек; 6 — зона глазной щели; 7 — стенка промежуточного мозга; 8 — вторичная полость глаза (полость стекловидного тела)

(место перегиба внутреннего слоя в наружный) — *радужки*. Глазные чаши связаны теперь с боковой стенкой промежуточного мозга, их породившей, узким глазным стебельком под некоторым углом к нему и поэтому на препаратах видны у основания переднего мозга. Покровная эктодерма в месте соприкосновения с нейральным зачатком глаза начинает инвагинировать внутрь полости глазной чаши (вторичной полости глаза), образуя *хрусталиковую плакоду*. Затем края хрусталиковой плакоды смыкаются, образуется пузырек — зачаток *хрусталика*, который отделяется от покровной эктодермы. После отделения *хрусталикового пузырька* эктодерма над ним просветляется и превращается в *рогови-*

цу глаза. Основные этапы формирования закладки глаза у амниот показаны на рис. 54. У передней границы telencephalon заметны два утолщения нейроэктодермы — *зачатки обонятельных плакод* (см. препараты на рис. 63). Позже отростки нервных клеток, развившихся в плакодах, будут вращаться в переднюю стенку полушарий и формировать здесь центр обоняния. Орган слуха закладывается в эктодерме на уровне продолговатого мозга около его боковой стенки сначала в форме двух углублений (слуховых ямок), а затем отшнуровавшихся *слуховых пузырьков* (см. рис. 52, *B*, а также препараты на рис. 63).

Производные мезодермы. Средний зародышевый листок еще на стадии нейруляции разделяется на несколько частей, различающихся по расположению в теле зародыша и по дальнейшей судьбе:

- 1) головная мезенхима;
- 2) хорда;
- 3) мезодерма сомитов (осевая мезодерма);
- 4) промежуточная мезодерма (или ножки сомитов, или нефротом);
- 5) латеральная (боковая) мезодерма (мезодерма боковой пластинки).

Головная мезенхима лежит спереди от первой пары сомитов. Головная мезодерма, в отличие от туловищной, не разделяется на дорсальную мезодерму и мезодерму боковой пластинки и состоит из рыхло лежащих мезенхимных клеток.

Материал хорды и сомитов называют дорсальной мезодермой. *Хорда* располагается вдоль центральной оси зародыша. При формировании позвонков клеточный материал хорды входит в состав межпозвоночных дисков. Материал дорсальной мезодермы, не вошедший в состав хорды, располагается по бокам от нее в виде двух пластов, из которых образуются *сомиты*. Сомиты закладываются парами (с двух сторон от хорды), их формирование начинается с головной области и распространяется в каудальном направлении (см. рис. 52). У эмбриона курицы каждый сомит представляет собой пузырек, стенка которого состоит из эпителизированных клеток. Впоследствии сомиты дифференцируются на *дерматом* (дорсолатеральная часть сомита), *миотом* (центральная часть) и *склеротом* (вентромедиальная часть) (рис. 55). Дерматом дает начало дерме кожи, миотом — мускулатуре осевого скелета, а склеротом — хрящам и костям осевого скелета. При этом первый позвонок формируется из задней половинки склеротома четвертого сомита и из передней половинки склеротома пятого, второй позвонок — из задней половинки склеротома пятого сомита и передней половинки склеротома шестого и т. д. Когда число пар сомитов достигает 8—10, передняя пара начинает рассеиваться. Ее клетки (как и клетки следующих двух пар сомитов) будут формировать мезодермальные структуры головы зародыша (оболочки

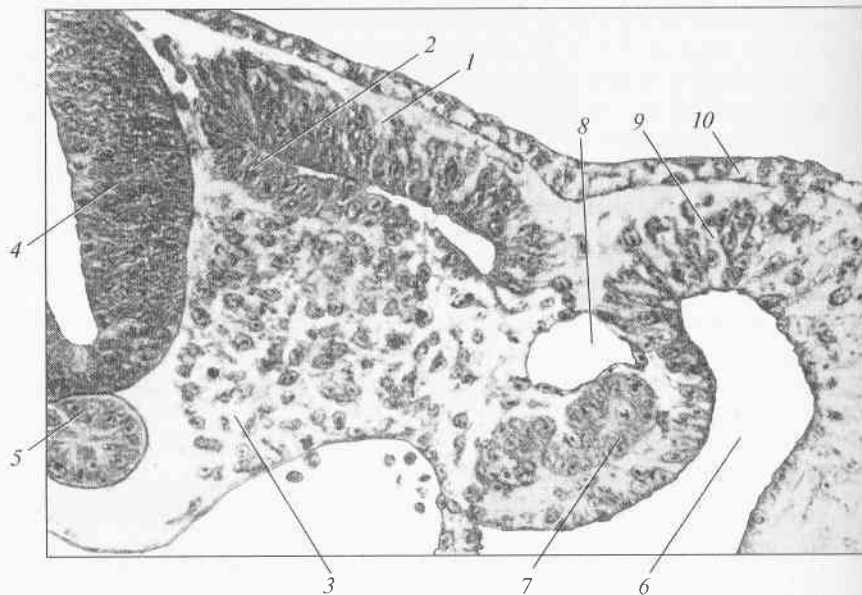


Рис. 55. Дифференцировка сомита:

1 — дерматом; 2 — миотом; 3 — склеротом; 4 — нервная трубка; 5 — хорда; 6 — целом; 7 — пронефрос; 8 — задняя кардинальная вена; 9 — париетальный листок латеральной мезодермы; 10 — эктодерма

мозга), участвовать в развитии мезодермальных частей органов чувств и др.

Промежуточная мезодерма сначала сегментируется, как и мезодерма сомитов, и формирует ножки сомитов. Впоследствии из промежуточной мезодермы последовательно образуются три поколения почек: пронефрос, мезонефрос и метанефрос (рис. 56), а также гонады. Все почки представляют собой парные образования. Пронефрос (*предпочка*, или *головная почка*) располагается в головном конце тела и у эмбрионов птиц как экскреторный орган не функционирует. Мезонефрос (*первичная*, или *туловищная почка*) образуется каудальнее пронефроса и у птиц функционирует как выделительный орган в эмбриональный период, а потом дегенерирует. Некоторые его протоки сохраняются в составе половых органов. Метанефрос (*вторичная*, или *тазовая почка*) возникает позже мезонефроса и каудальнее него. Он начинает функционировать в поздний эмбриональный период и существует как постоянная почка у взрослого организма. Пронефрос у зародыша курицы закладывается на стадии инкубации 36 ч, а мезонефрос — примерно 55 ч (стадия 29—30 сомитов).

В процессе дифференцировки промежуточной мезодермы дистальная часть ножек сомитов, начиная с краниальной области,

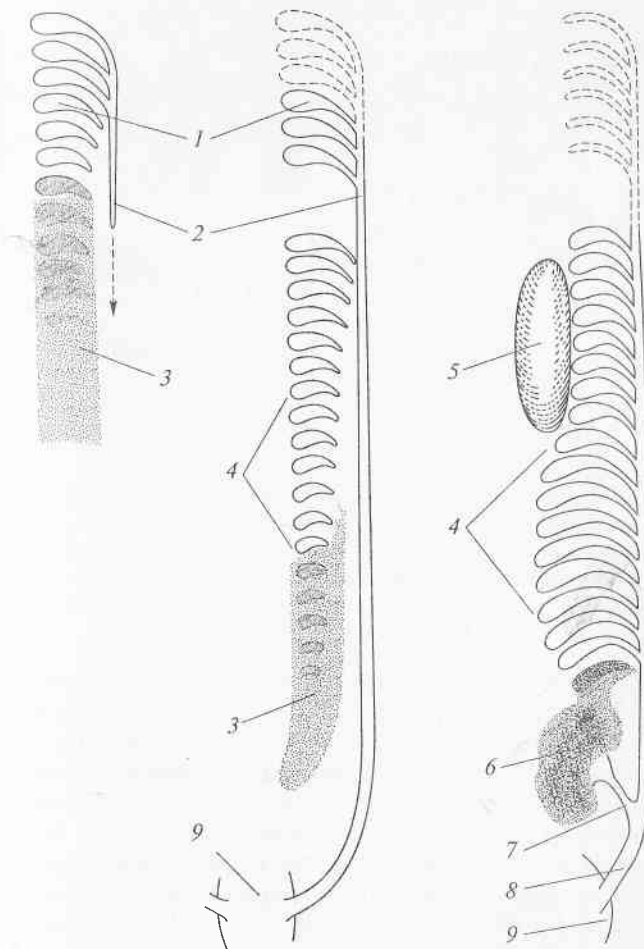


Рис. 56. Смена трех поколений почек в эмбриогенезе амниот:

1 — пронефрос; 2 — вольфов канал; 3 — недифференцированная мезенхима урогенитальной области; 4 — мезонефрос; 5 — гонада; 6 — метанефрос; 7 — мочеточник; 8 — проток мезонефроса; 9 — клоака

сливается в длинный тяж. В нем возникают первичные почечные протоки (левый и правый), с которыми соединяются канальцы пронефроса, а позже — и мезонефроса (рис. 56, 57). С того момента, как первичные почечные протоки соединяются с канальцами мезонефроса, их называют *мезонефрическими протоками*, или *вольфовыми каналами*.

Позднее в каудальной области каждого протока, вблизи от места их впадения в клоаку, образуется дивертикул — будущий мочеточник. Он индуцирует формирование структур мезонефроса из наиболее каудальной части промежуточной мезодермы.

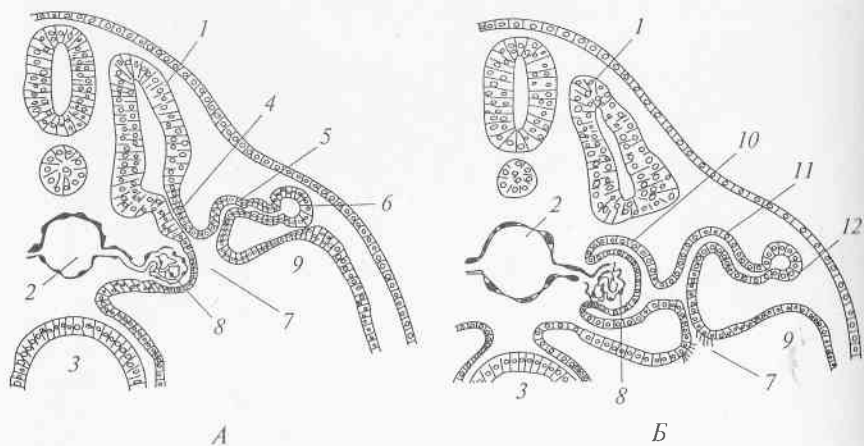


Рис. 57. Функциональные каналцы proneфроса (А) и мезонефроса (В) на поперечном срезе зародыша курицы:

1 — сомит; 2 — дорсальная аорта; 3 — кишка; 4 — промежуточная мезодерма (ножка сомита); 5 — каналец proneфроса; 6 — проток proneфроса; 7 — нефростом; 8 — клубочек; 9 — целом; 10 — боуменова капсула; 11 — каналец мезонефроса; 12 — проток мезонефроса

На ранних этапах формирования мезонефроса медиальнее вольфовых протоков формируется *мюллеров проток*, который не участвует в формировании выделительных органов. При дифференцировке пола по женскому типу вольфовы каналы и каналцы мезонефроса дегенерируют, а из мюллеровых протоков образуются яйцеводы. При дифференцировке пола по мужскому типу, напротив, мюллеровы протоки существуют недолгое время на начальных этапах дифференцировки почек, а потом дегенери-

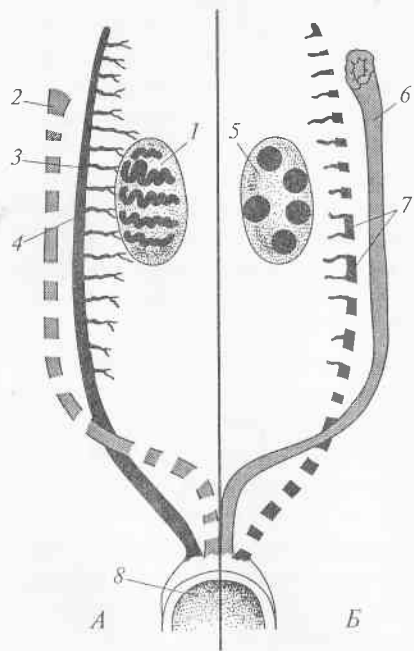


Рис. 58. Дифференцировка пола по мужскому (А) и женскому (В) типу: 1 — семенник; 2 — дегенерирующий мюллеров проток; 3 — вольфов канал (образует выводящие протоки семенника); 4 — каналец мезонефроса (образует придаток семенника); 5 — яйчник; 6 — мюллеров проток (образует яйцевод); 7 — дегенерирующий вольфов канал; 8 — клоака



Рис. 59. Формирование сердечной трубки из парных закладок:

А — образование эндокардиальных пузырьков в висцеральном листке латеральной мезодермы; кишечные ворота находятся на уровне сердечной закладки; В — парные закладки эндокарда и эпимиокарда сближаются, образуя закладку сердца, которая расположена вентральнее кишки зародыша; В — парные закладки эндокарда сливаются, образуя сердечную трубку; 1 — париетальная латеральная мезодерма; 2 — хорда; 3 — нервная трубка; 4 — сомит; 5 — эктодерма; 6 — закладка миокарда; 7 — закладка кишки; 8 — парная закладка сердечной трубки в области висцеральной латеральной мезодермы зародыша; 9 — энтодерма; 10 — миокард; 11 — дорсальная брыжейка; 12 — кардинальные вены; 13 — эндокард; 14 — целом

руют, а из каналцев мезонефроса и вольфовых каналов формируются придатки семенника и семявыводящий канал (рис. 58). Латеральная мезодерма не сегментируется, а разделяется на два листка — *париетальную* (наружную) латеральную мезодерму, прилежащую к эктодерме, и *висцеральную* (внутреннюю) латеральную мезодерму, прилежащую к энтодерме. Париетальная мезодерма зародышевой области участвует в формировании стенки тела цыпленка и почек конечностей. Висцеральная мезодерма дает начало мезодермальной компоненте кишечника, печени, легких и некоторых других внутренних органов зародыша. Из нее образуется также закладка сердца. Начальные этапы формирования сердечной трубки из парных закладок показаны на рис. 59 и 60. Закладка зачатка сердца в виде двух эндокардиальных трубок на стадии инкубации 25—26 ч на уровне передних кишечных ворот (см. рис. 59, А). В процессе формирования туловищной складки и отделения тела зародыша от внезародышевой области парные закладки сердца сближаются и к 27-му часу инкубации их эпимиокардиальные области объединяются вентральнее кишки зародыша (см. рис. 59, В). К 29-му часу инкубации сливается эндокардиальная выстилка двух сердечных трубок и образуется непарная закладка сердца.

На стадии инкубации 30 ч закладка сердца начинает подразделяться на отделы и изгибаться вправо (см. рис. 60, А, В). К 36—38-му часу сердечная трубка приобретает U-образную форму (рис. 60, В) и на тотальных препаратах эмбрионов этого возраста хоро-

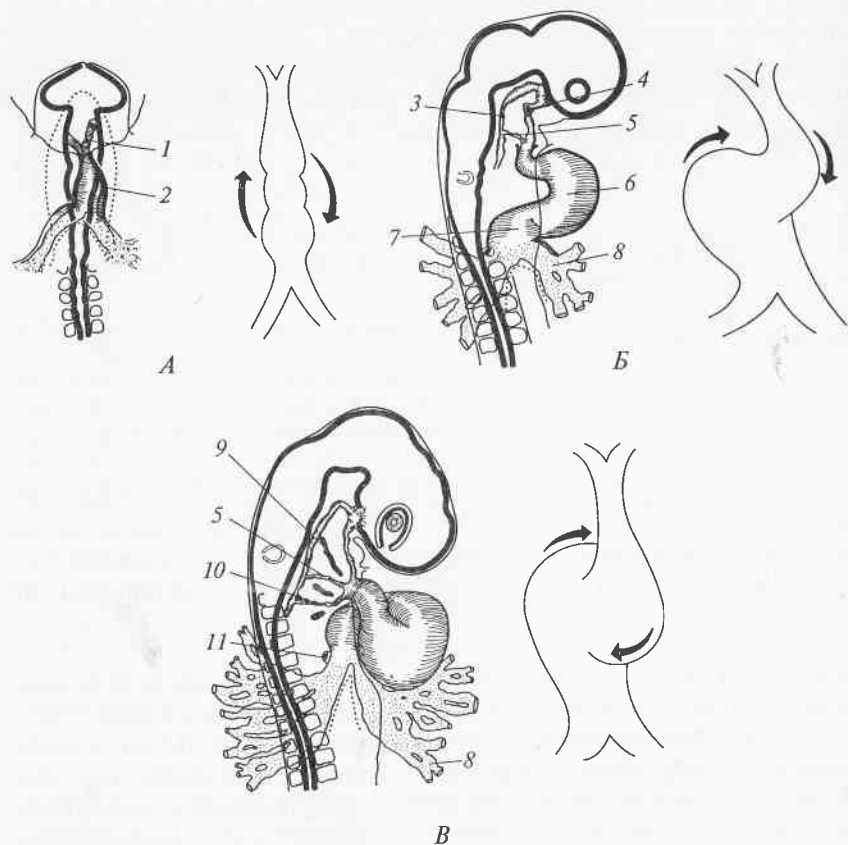


Рис. 60. Формирование изгиба сердечной трубки у эмбриона курицы (направление показано стрелками):

А — закладка сердца у эмбриона на стадии трех мозговых пузырей (до начала изгибания сердечной трубки); *Б* — закладка сердца у эмбриона на стадии 20—22 сомитов (изгибание сердечной трубки — разрастание левой стенки предсердия); *В* — закладка сердца у эмбриона на стадии 25 сомитов (более поздняя стадия изгибания — разрастание правой стенки желудочка); 1 — ветви вентральной брюшной аорты; 2 — зачаток сердца; 3 — ветвь дорсальной аорты; 4 — первая дуга аорты; 5 — вторая дуга аорты; 6 — желудочек; 7 — предсердие; 8 — желточные вены; 9 — первая жаберная щель; 10 — третья дуга аорты; 11 — общая кардинальная вена

шо различимы предсердие и желудочек (см. рис. 61, *Б*, *Г*). Во внезародышевую область от закладки сердца отходят два крупных сосуда — желточные вены, а от желудочка в краниальном направлении отходят два ствола вентральной аорты.

Во внезародышевой области париетальный листок латеральной мезодермы участвует в формировании амниона и серозы, а висцеральный листок — в формировании стенки желточного мешка и аллантоиса (цв. вкл. IV).

На стадии поворота на уровне повернувшегося на левый бок зачатка мозга непосредственно под ним видна хорда. Ее передний конец доходит до уровня среднего мозга, что, по-видимому, способствует образованию первого мозгового изгиба. В шейном отделе зародыша хорда скрывается под нервной трубкой спинного мозга. В туловищной, а затем и в хвостовой областях зародыша продолжается сомитогенез: от 19 пар — на стадии инкубации 48 ч до 40 пар — к концу третьих суток. Сомиты видны как парные образования на протяжении плоско лежащей части зародыша, а на уровне поворота (шейный отдел) левый ряд сомитов скрывается под нервной трубкой, а правый ряд ложится над ней (см. рис. 52).

Зачаток сердца (висцеральная мезодерма) располагается в целом выше уровня поворота в форме петлеобразной изогнутой трубки. Часть зачатка сердца, образованная слиянием зачатков желточных вен, лежит глубже на желтке. Отходящие от нее вены уходят на желточный мешок: правая вена идет под головой вперед, левая — под телом зародыша на уровне поворота идет вниз, на желточный мешок и здесь разветвляется на сеть мельчайших капилляров (см. рис. 52, *Б*, *В*). Часть зачатка сердца — артериальный конус — лежит выше, переходит в брюшную аорту, разветвляясь на жаберные артерии, которые сливаются под хордой в спинную аорту. Спинная аорта тянется вдоль головы и на уровне поворота раздваивается. В туловищной части обе ветви спинной аорты, перегибаясь почти под прямым углом, выходят на стенку желточного мешка. У края желточного мешка аорта разветвляется на мельчайшие капилляры. Капилляры вступают в контакт с капиллярной сеткой желточных вен. Характерной особенностью желточного кровообращения цыпленка является то, что артериальные сосуды выносят на желточный мешок из зародыша венозную кровь, а венозные капилляры собирают со стенок желточного мешка обогащенную кислородом артериальную кровь и несут ее к сердцу зародыша. Таким образом, стенка желточного мешка выполняет функцию органа дыхания (цв. вкл. IV, *Б*).

Производные энтодермы. На третьи сутки инкубации уже сформирована головная кишка зародыша, которая является производным энтодермы (цв. вкл. IV). В этот период развития формируются четыре пары жаберных щелей (четвертая недоразвитая), в стенках которых проходят жаберные артерии. К этому времени завершается сомитогенез в хвостовой части и начинается развитие задней кишки. Механизм развития хвостовой кишки сходен с механизмом развития головной кишки, незамкнутая часть хвостовой кишки называется задними кишечными воротами. Под сомкнутую часть хвостовой кишки врастает хвостовая часть туловищной складки, начиная таким образом отделять хвостовую часть зародыша от стенки его желточного мешка.

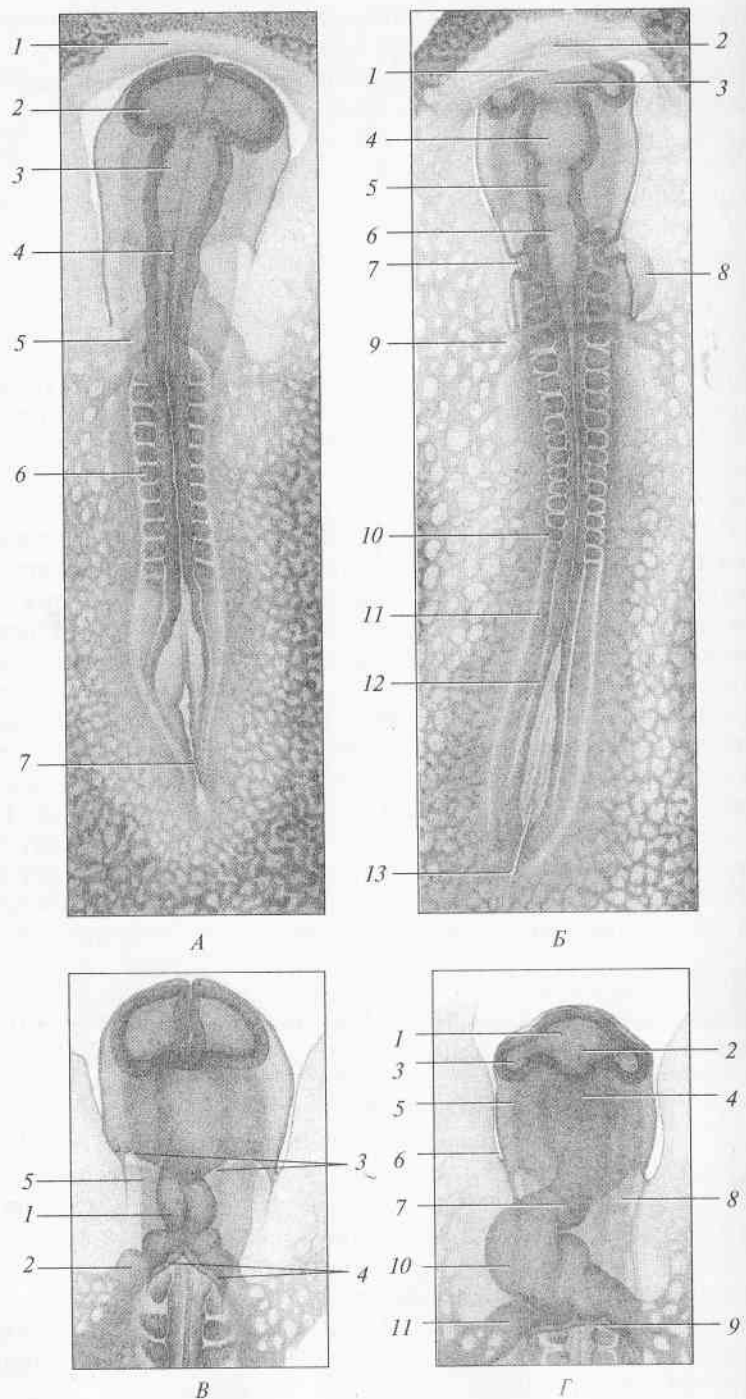


Рис. 61. Зародыши на стадии раннего органогенеза (тотальный препарат):

А — стадия трех мозговых пузырей (вид с дорсальной стороны): 1 — закладка амниотической складки; 2 — первичный передний мозг (prosencephalon); 3 — средний мозг (mesencephalon); 4 — первичный задний мозг (rhombencephalon); 5 — левая желточная вена; 6 — сомит; 7 — первичная бороздка. *Б* — стадия пяти мозговых пузырей (вид с дорсальной стороны): 1 — край амниотической складки; 2 — передний мозг (telencephalon); 3 — промежуточный мозг (diencephalon); 4 — средний мозг (mesencephalon); 5 — задний мозг (metencephalon); 6 — продолговатый мозг (myelencephalon); 7 — слуховая ямка; 8 — зачаток сердца; 9 — желточная пена; 10 — сомит; 11 — несегментированная осевая (сомитная) мезодерма; 12 — валик нервной пластинки; 13 — остаток первичной бороздки. *В* — передний отдел зародыша на стадии трех мозговых пузырей (вид со стороны желтка): 1 — парный зачаток сердца; 2 — желточная вена; 3 — край головной складки; 4 — передние кишечные ворота; 5 — головная кишка. *Г* — передний отдел зародыша на стадии пяти мозговых пузырей: 1 — telencephalon; 2 — diencephalon; 3 — правый глазной пузырь; 4 — mesencephalon; 5 — боковой край головной кишки; 6 — боковой край головы; 7 — головная складка; 8 — головная кишка; 9 — передние кишечные ворота; 10 — зачаток сердца; 11 — желточная вена

Энтодерма кишки зародыша в дальнейшем участвует в формировании многих внутренних органов, которые начинают формироваться как дивертикулы (выросты) соответствующих отделов кишки зародыша. Это закладки щитовидной и двух пар паращитовидных желез (глочная область кишки), трахеи, бронхов и легких (задняя часть глотки) и печени (область кишки каудальнее желудка). Поджелудочная железа начинает формироваться как два парных и один непарный дивертикул кишки, которые появляются в области закладки печени. У четырехдневных куриных эмбрионов каудальная часть задней кишки расширяется. Это зачаток клоаки. Фабрициева сумка, один из основных органов иммунитета у птиц, формируется как дивертикул клоаки и тоже имеет в своем составе энтодермальный компонент. В состав этих органов кроме энтодермы входит висцеральный листок латеральной мезодермы.

Препараты к занятию «Начало органогенеза птиц»

Препарат № 1. Эмбрион курицы на стадии трех мозговых пузырей (30—33 ч инкубации): тотальный препарат

Задание. Рассмотрите тотальный препарат под бинокулярной лупой или под малым увеличением микроскопа и зарисуйте его. На рисунке укажите уровень расположения передних кишечных ворот, положение заднего невропора, структуры головного мозга и других формирующихся органов зародыша. Подсчитайте и запишите количество пар сомитов (рис. 61, *А*).

На стадии трех мозговых пузырей передний невропор замыкается. Головная часть нервной трубки слабыми поперечными перетяжками подразделена три мозговых пузыря: первичный передний мозговой пузырь (prosencephalon), средний мозговой пузырь (mesencephalon), первичный задний мозговой пузырь (rhombencephalon). При этом задний мозговой пузырь без видимых границ переходит в зачаток спинного мозга. Передний мозговой пузырь — самый большой, его боковые стенки являются зачатками нейральных частей глаза (сетчатки, радужки и пигментного эпителия). Часто на этой стадии развития можно увидеть слабовыраженные дополнительные перетяжки в области первичного заднего мозгового пузыря — так называемые *ромбомеры*. Их всего восемь, при последующем развитии от ромбомеров отходят пятая—десятая пары черепных нервов. Задний невропор находится на уровне сформированных сомитов.

Головная складка находится примерно на уровне среднего отдела головного мозга, а передние кишечные ворота — каудальнее заднего мозгового пузыря или на уровне границы между головным и спинным мозгом. Парные зачатки сердца на уровне передних кишечных ворот объединяются, образуя общий сосуд (трубку), который изгибается в правую сторону.

На тотальных препаратах эмбриона курицы этой стадии развития передние кишечные ворота визуальным накладываются на формирующуюся закладку сердца. Чтобы их увидеть на тотальном препарате, надо повернуть макровинт микроскопа и перейти в другую оптическую плоскость (закладка сердца лежит вентральнее кишки зародыша).

Осевая мезодерма образует примерно 7—10 пар сомитов, при этом первая пара сомитов рассеивается.

На этом препарате, как и на тотальных препаратах стадии нейруляции, хорошо заметен краниокаудальный градиент в развитии. Видимая морфологическая картина в задней части тела зародыша соответствует нейруляции, а на ранней стадии трех мозговых пузырей в самой каудальной части можно различить и структуру гензеновского узелка.

Препарат № 2. Эмбрион курицы на стадии пяти мозговых пузырей (35—40 ч инкубации): тотальный препарат

Задание. Рассмотрите тотальный препарат под бинокулярной лупой и под малым увеличением микроскопа, зарисуйте его. На рисунке укажите уровень расположения передних кишечных ворот, положение заднего невропора, структуры головного мозга и других формирующихся органов зародыша. Подсчитайте и за-

пишите количество пар сомитов. По строению закладки сердца определите, как расположен зародышевый диск на тотальном препарате — дорсальной стороной вверх (см. рис. 61, Б) или вниз (рис. 61, Г); укажите на рисунке правую и левую стороны зародыша.

На стадии пяти мозговых пузырей передний пузырь (prosencephalon) преобразуется в два путем небольшого выпячивания своей передней стенки. Это передний мозг (telencephalon) — зачаток больших полушарий. Основная масса клеток prosencephalon образует второй мозговой пузырь (diencephalon) — зачаток промежуточного мозга. Средний мозговой пузырь (mesencephalon) остается без видимых изменений и является зачатком среднего мозга. Задний мозговой пузырь (rhombencephalon) путем поперечной перетяжки подразделяется на два: четвертый мозговой пузырь (metencephalon) — зачаток мозжечка и варолиева моста и пятый мозговой пузырь (myelencephalon) — зачаток продолговатого мозга. На уровне среднего мозгового пузыря намечается первый изгиб зачатка мозга, направленный в сторону желтка.

В области промежуточного мозга четко видны боковые выпячивания — глазные пузыри. Они связаны с мозгом тонкими «глазными стебельками». Глазные пузыри подрастают к покровной эктодерме.

В эктодерме над задним мозгом образовались два углубления — слуховые ямки, зачатки органа слуха.

Средняя часть сердечной трубки — зачатка сердца — выпячивается вправо и хорошо видна сбоку от головного мозга, это будущая желудочковая часть сердца. По краю *area pellucida* расположена хорошо сформированная сеть кровяных островков. Осевая мезодерма образует примерно 12—16 пар сомитов.

Головная часть туловищной складки находится на уровне задних отделов головного мозга, а передние кишечные ворота — на уровне границы головного и спинного мозга. Передние кишечные ворота на этой стадии развития находятся на уровне отхождения от закладки сердца желточных вен и накладываются на каудальную стенку венозного синуса. Как и при зарисовке предыдущего препарата, чтобы их увидеть на тотальном препарате, надо повернуть макровинт микроскопа и перейти в другую оптическую плоскость.

На этой стадии развития начинает формироваться головная складка амниона. На тотальном препарате она сначала видна как полумесяц спереди от тела зародыша, более темный, чем окружающие его структуры зародышевого диска. В конце стадии пяти мозговых пузырей, перед началом поворота, головная складка амниона покрывает всю область переднего мозга. Начинается формирование задней и боковых частей туловищной складки.

Препарат № 3. Эмбрион курицы на стадии поворота (48—56 ч инкубации): тотальный препарат

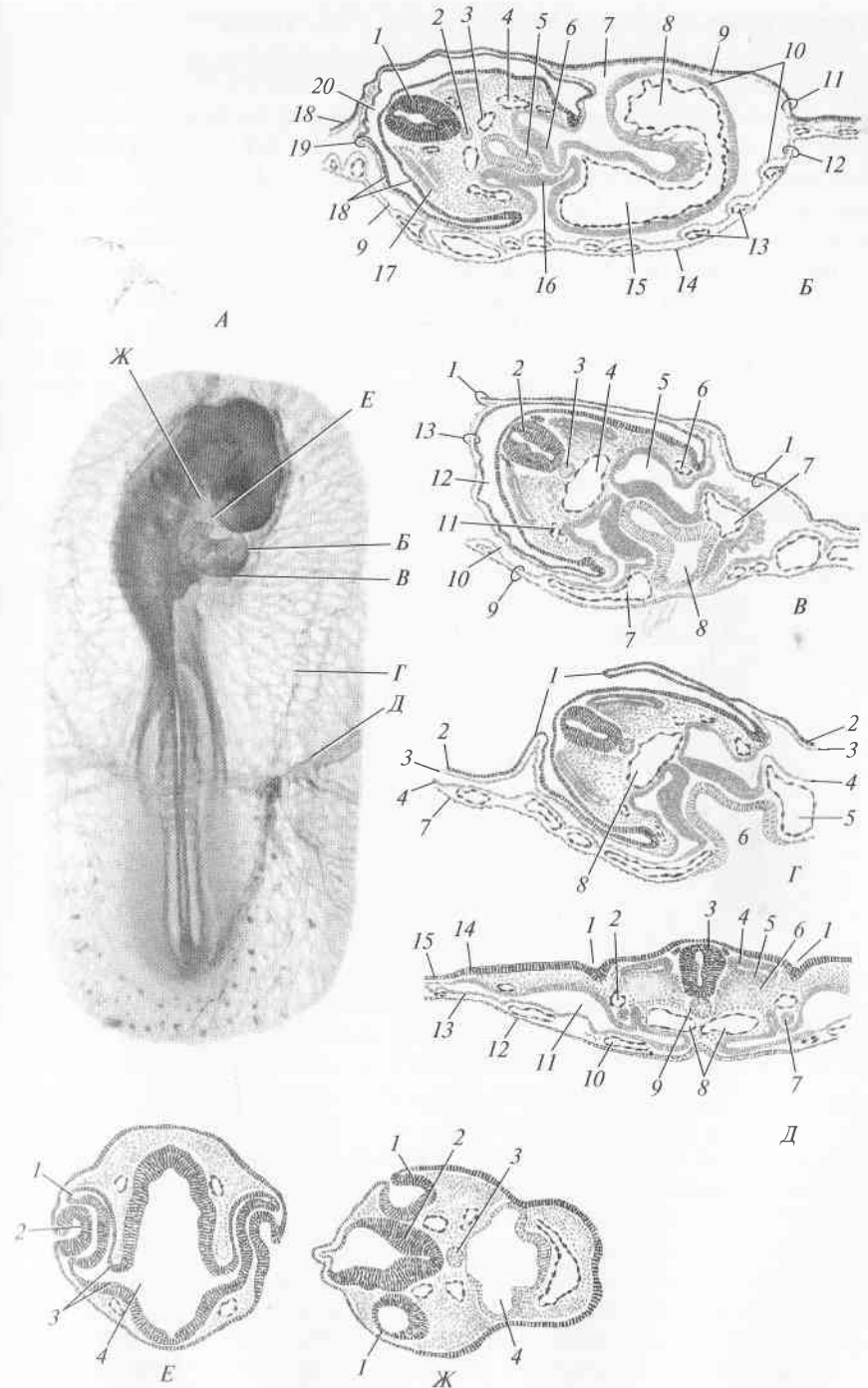
Задание. Рассмотрите тотальный препарат под бинокулярной лупой и зарисуйте его. Тотальный препарат эмбриона курицы этой стадии развития имеет толщину более 1 мм, поэтому, если для задания используется не бинокулярная лупа, а микроскоп, то следует соблюдать особую осторожность и пользоваться только самым малым увеличением. На рисунке укажите правую и левую стороны зародыша, уровень расположения передних кишечных ворот, структуры головного мозга и других формирующихся органов.

На рис. 62, *А* показан эмбрион курицы на стадии поворота. Головной мозг изогнут и видна выступающая вперед его часть — *mesencephalon*.

Поворот начинается в краниальной области и распространяется в каудальном направлении. В конце вторых суток инкубации начинается образование первого мозгового изгиба в области среднего мозга. Лежащие впереди него промежуточный и передний

Рис. 62. Зародыш на стадии поворота (51—56 ч инкубации):

А — схема, показывающая уровни срезов. *Б* — поперечный срез зародыша на уровне сердца: 1 — нервная трубка; 2 — хорда; 3 — дорсальная аорта; 4 — передняя кардинальная вена; 5 — зачаток эпителиальной выстилки кишки (энтодерма); 6 — зачаток мышечной выстилки кишки (висцеральная мезодерма); 7 — целом; 8 — желудочек сердца; 9 — париетальный листок мезодермы; 10 — висцеральный листок мезодермы; 11 — сероза; 12 — стенка желточного мешка; 13 — кровеносные сосуды в стенке желточного мешка; 14 — внезародышевая энтодерма; 15 — предсердие; 16 — дорсальная брыжейка; 17 — дерматом сомита; 18 — эктодерма; 19 — стенка амниона; 20 — амниотическая полость. *В* — поперечный срез зародыша на уровне отхождения желточных вен: 1 — сероза; 2 — нервная трубка; 3 — хорда; 4 — дорсальная аорта; 5 — целом; 6 — задняя кардинальная вена; 7 — желточная вена; 8 — кишка; 9 — стенка желточного мешка; 10 — внезародышевый целом (экзоцелом); 11 — передняя кардинальная вена; 12 — амниотическая полость; 13 — стенка амниона. *Г* — поперечный срез зародыша на уровне смыкания амниотических складок: 1 — амниотические складки; 2 — внезародышевая эктодерма; 3 — париетальный листок мезодермы; 4 — висцеральный листок мезодермы; 5 — желточная вена; 6 — кишка; 7 — внезародышевая энтодерма; 8 — дорсальная аорта. *Д* — поперечный срез зародыша на уровне туловищного отдела: 1 — места образования боковых частей туловищной складки; 2 — задняя кардинальная вена; 3 — нервная трубка; 4 — дерматом; 5 — миотом; 6 — склеротом; 7 — нефротом (проток мезонефроса); 8 — дорсальная аорта; 9 — хорда; 10 — кровеносный сосуд; 11 — целом; 12 — энтодерма; 13 — висцеральный листок мезодермы; 14 — париетальный листок мезодермы; 15 — эктодерма. *Е* — поперечный срез на уровне закладки глазных зачатков: 1 — глазной бокал; 2 — хрусталиковая плакода; 3 — глазной стебелек; 4 — полость промежуточного мозга. *Ж* — поперечный срез на уровне закладки слуховых пузырьков: 1 — слуховой пузырек; 2 — продолговатый мозг; 3 — хорда; 4 — кишка



ФОРМИРОВАНИЕ ВНЕЗАРОДЫШЕВЫХ ОБОЛОЧЕК У ПТИЦ

отделы мозга начинают поворачиваться под углом 90° по отношению к позади лежащим заднему и продолговатому мозгу в сторону желтка (см. рис. 53). Одновременно все отделы мозга, развиваясь каждый в своем направлении, проявляют тенденцию к повороту на левую сторону по отношению к желтку. Таким образом, вся передняя часть зародыша вместе с зачатком мозга будет поворачиваться на левый бок. Этому способствуют уже произошедшее ранее образование головной кишки и ее отделение от стенки желточного мешка посредством туловищной складки.

На третьей сутки инкубации передняя часть зародыша поворачивается на левую сторону. В это время можно наблюдать дальнейшее развитие всех заложившихся ранее органов. Происходит образование задней части туловищной складки, формируются хвостовая почка и задняя кишка зародыша.

Позднее, по завершении поворота, эмбрион полностью отделяется от желтка и принимает С-образную форму, характерную для эмбрионов всех амниот (см. далее рис. 63, А).

Дополнительное задание. Вскрытие куриных яиц на вторые-третьи сутки инкубации и приготовление временных тотальных препаратов. Материалы для этого задания приведены в разделе «Птицы. Работа с живым материалом (развитие эмбриона курицы)».

Птицы, рептилии и млекопитающие относятся к группе амниот — животных, эмбриональное развитие которых протекает во внезародышевых оболочках. Всего внезародышевых оболочек (органов) четыре:

- 1) амнион;
- 2) хорион (сероза);
- 3) желточный мешок;
- 4) аллантоис.

Внезародышевые органы выполняют разные функции и различаются по тому, какие зародышевые листки участвуют в их формировании. *Амнион* и *хорион* образуются из слоя клеток, образованного эктодермой и париетальным листком латеральной мезодермы, называемым *соматоплеврой*. По своему происхождению амнион и хорион являются соматоплевральными внезародышевыми оболочками. Стенка желточного мешка и аллантоис образуются в результате разрастания слоя клеток, образованного энтодермой и висцеральным листком латеральной мезодермы — *спланхноплеврой*. По своему происхождению желточный мешок и аллантоис являются спланхноплевральными внезародышевыми органами (цв. вкл. V, А и VI, А).

Желточный мешок выполняет функцию органа питания. Висцеральный листок мезодермы, входящий в состав стенки желточного мешка, развивает мощную систему кровеносных сосудов и капилляров (цв. вкл. V, Б), по которой питательные вещества из желточного мешка переносятся в тело зародыша. Желточный мешок соединяется со средней кишкой зародыша тонкой трубкой — желточным стебельком, внутри которого находится желточный проток. Однако питательные вещества через желточный проток в тело зародыша не поступают. В утилизации желтка участвуют клетки стенки желточного мешка. Сначала энтодермальные клетки расщепляют белки желтка яйца до растворимых аминокислот, которые потом поступают в кровеносные сосуды мезодермы и с кровотоком переносятся в тело зародыша. Кроме того, желточный мешок является органом внезародышевого кроветворения. В мезодерме желточного мешка закладываются кровяные островки, которые дают первую генерацию клеток крови зародыша и являются источником стволовых кро-

ветворных клеток. Последние мигрируют по внезародышевым кровеносным сосудам и заселяют кроветворные органы зародыша.

Амнион — внезародышевый орган, закладывается вместе с хорионом в виде складки на стенке желточного мешка в его головном отделе (головная амниотическая складка) в середине вторых суток инкубации. Он состоит из внезародышевой эктодермы и париетального листка внезародышевой мезодермы. Складка из этих листков в течение третьих суток инкубации нарастает на тело зародыша до уровня поворота и вдоль его тела.

На третьи сутки инкубации формируется хвостовая амниотическая складка, она начинает подниматься над хвостовой частью тела зародыша, достигая примерно уровня растущей хвостовой кишки.

К началу четвертых суток инкубации амниотические складки все больше нарастают над телом зародыша и покрывают его, образуя сначала заметной величины отверстие, а затем смыкаются, оставляя узкое воронкообразное отверстие — сероамниотический проток.

Таким образом, над телом зародыша создается полость, которая через сероамниотический проток заполняется жидкой фракцией белка из белковой (третичной) оболочки яйца. С этого времени зародыш оказывается погруженным в жидкую среду, соответствующую водной среде обитания низших позвоночных животных. Жидкость амниона примерно на 14-е сутки инкубации становится дополнительным к желтку источником питания цыпленка непосредственно через формирующийся рот и желудочно-кишечный тракт.

Аллантоис формируется как дивертикул задней кишки зародыша, разрастающийся в полость экзоцелома и вытесняющий его (цв. вкл. V, А). У птиц аллантоис представляет собой большой мешок, в котором накапливаются и хранятся до вылупления цыпленка токсические продукты метаболизма зародыша. В основном это продукты азотистого обмена, накапливающиеся в виде солей мочевой кислоты.

Хорион (сероза) образует внешнюю внезародышевую оболочку эмбриона и выполняет защитную функцию. По мере разрастания аллантоиса висцеральная мезодерма, покрывающая его снаружи, прирастает к париетальной мезодерме хориона — формируется *хориоаллантоис*. В хориоаллантоисной оболочке из материала висцеральной мезодермы формируется большое число кровеносных сосудов, образующих густую капиллярную сеть. Она осуществляет газообмен, т. е. выполняет функцию дыхания зародыша (цв. вкл. V, Б). Хориоаллантоис обеспечивает также растворение кальция скорлупы, который необходим для остеогенеза, и его транспорт к зародышу.

Препараты к занятию

«Формирование внезародышевых оболочек у птиц»

На рис. 62 в предыдущем занятии изображены поперечные срезы зародыша курицы на стадии поворота (около 55 ч инкубации), показывающих внутреннее строение разных участков его тела (два среза через краниальную часть тела показаны без внезародышевых оболочек) (рис. 62, Е, Ж). Однако для объяснения процессов формирования стенки желточного мешка, амниона и хориона (серозы) наиболее показательны три уровня поперечных срезов (рис. 62, Б, В, Г). Для демонстрации начальных стадий формирования аллантоиса рекомендуется использовать временный или постоянный тотальный препарат на стадии полного завершения поворота (около 96 ч инкубации).

Препарат № 1. Эмбрион курицы на стадии поворота: поперечный срез зародыша на уровне сердца

Задание. Рассмотрите препарат под малым увеличением микроскопа и зарисуйте его. На рисунке укажите амнион, хорион, стенку желточного мешка, а также зародышевые листки, их составляющие (эктодерму, энтодерму, париетальную и висцеральную латеральную мезодерму). Укажите амниотическую полость и полость экзоцелома. В области тела зародыша подпишите структуры, относящиеся к формирующимся внутренним органам, в соответствии со схемами, показанными на рис. 62, Б.

На данной стадии развития (около 55 ч) срез на уровне сердца проходит краниальнее уровня прохождения поворота. На препарате тело эмбриона полностью отделено от желтка, лежит на боку между пластом хориона и пластом стенки желточного мешка. Боковые части стенки тела зародыша резко переходят в стенку амниона, крупная закладка сердца оказывается лежащей вне тела в полости экзоцелома и его предсердие соединяется с зародышевой областью дорсальной брыжейкой. На некоторых препаратах срез проходит через U-образную сердечную трубку таким образом, что желудочек выглядит как лежащий отдельно в полости экзоцелома тонкостенный пузырь.

В стенке желточного мешка, в состав которой входит висцеральная латеральная мезодерма, видны крупные кровеносные сосуды (ветви желточных вен и артерий). Стенка хориона более тонкая и состоит практически из двух слоев клеток: слоя эпителизированной эктодермы и париетальной мезодермы, состоящей из одного слоя вытянутых клеток.

**Препарат № 2. Эмбрион курицы на стадии поворота:
поперечный срез зародыша
на уровне смыкания амниотических складок**

Задание. Рассмотрите препарат под малым увеличением микроскопа и зарисуйте его. На рисунке укажите амниотические складки, стенку желточного мешка, а также зародышевые листки, их составляющие (эктодерму, энтодерму, париетальную и висцеральную латеральную мезодерму). Укажите полость экзопелома. В области тела зародыша подпишите структуры, относящиеся к формирующимся внутренним органам, в соответствии со схемами на рис. 62, Г.

На данной стадии развития срез на уровне смыкания амниотических складок приходится на уровень прохождения поворота. На препарате дорсовентральная ось тела эмбриона наклонена по отношению к стенке желточного мешка (и плоскости зародышевого диска) под углом примерно 45°, кишка эмбриона не замкнута. Соматоплевра образует две амниотические складки, которые сближаются, накрывая тело зародыша. В стенке желточного мешка лежат крупные сосуды. Самые большие из них, на границе зародышевой и внезародышевой области, — желточные вены. В зародышевой области вентральнее хорды лежит крупный непарный кровеносный сосуд — дорсальная аорта, которая, как и сердце, образовалась в результате слияния парной сосудистой закладки.

**Препарат № 3. Эмбрион курицы на стадии поворота:
поперечный срез через туловищный отдел**

Задание. Рассмотрите препарат под малым увеличением микроскопа и зарисуйте его. На рисунке укажите места образования боковых туловищных складок, соматоплевру и спланхноплевру, зародышевые листки, их составляющие (эктодерму, энтодерму, париетальную и висцеральную латеральную мезодерму), а также амниотические складки. Укажите полость целома. В области тела зародыша подпишите структуры, соответствующие формирующимся внутренним органам в соответствии со схемами, приведенными на рис. 58 и 62, Д.

На данной стадии развития срез через туловищный отдел зародыша проходит каудальнее уровня распространения поворота и дорсовентральная ось тела зародыша лежит перпендикулярно к плоскости зародышевого диска. Разделения на зародышевую и внезародышевую часть в этой области еще нет и кишка эмбриона не замкнута. В дорсальной части тела зародыша кроме нервной

трубки можно различить несколько клеток — остаток нервного гребня. Хорошо видно разделение сомитов на дерматом, миотом и склеротом. Вентральнее хорды лежат два крупных сосуда — два ствола дорсальной аорты, которая в каудальной части эмбриона в возрасте 55 ч развития еще представлена парной закладкой. По бокам от стволов дорсальной аорты располагается область нефротомы. В ней различимы структуры канальцев мезонефроса, а также проток мезонефроса (вольфов канал).

**Препарат № 4. Начальный этап формирования
аллантаиса: тотальный препарат четырехсуточного
эмбриона курицы**

Задание. Рассмотрите тотальный препарат под бинокулярной лупой и зарисуйте его. На рисунке укажите аллантаис, почки передних и задних конечностей, хвостовую почку. Подсчитайте число жаберных щелей, укажите на рисунке структуры головного мозга и других формирующихся органов зародыша (рис. 63).

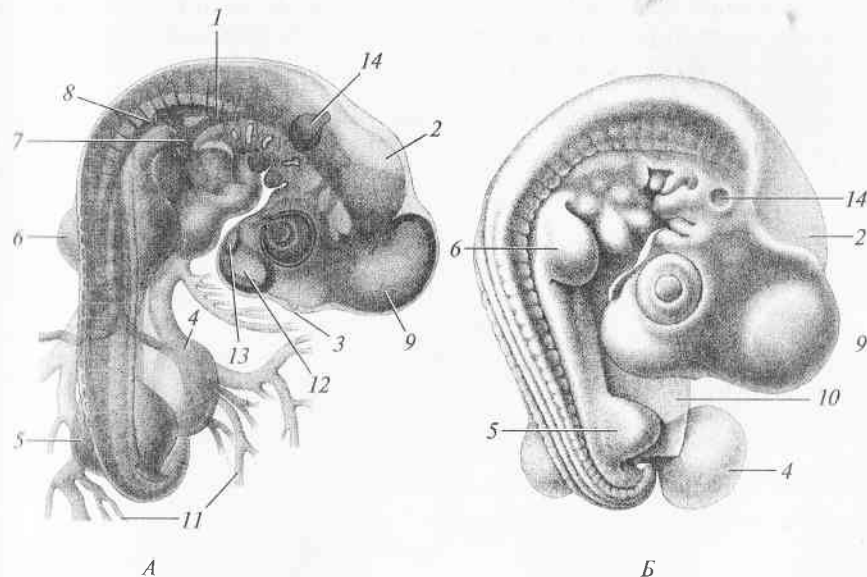


Рис. 63. Куриные зародыши в возрасте 4 (А) и 4,5 (Б) суток инкубации: 1 — передняя кардинальная вена; 2 — задний мозг; 3 — эпифиз (вырост дорсальной стенки промежуточного мозга); 4 — аллантаис; 5 — зачаток задней конечности; 6 — зачаток передней конечности; 7 — Кюльверов проток; 8 — задняя кардинальная вена; 9 — средний мозг; 10 — стенка амниона; 11 — желточные артерии; 12 — закладка полушарий переднего мозга; 13 — обонятельные плакаты; 14 — слуховой пузырь

РАННЕЕ РАЗВИТИЕ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

У четырехдневного эмбриона курицы хорошо заметен аллантоис в виде шарообразного образования, выдающегося во внезародышевую область на уровне почек нижних конечностей. Стенка аллантоиса имеет сетчатую структуру — это видны кровеносные сосуды, формирующиеся в висцеральной мезодерме, входящей в состав стенки аллантоиса.

Жаберные щели у эмбриона курицы образуются, когда сливаются наружные эктодермальные жаберные углубления с энтодермальными глоточными карманами. Первая жаберная щель прорывается у эмбриона к 46-му часу инкубации. Потом прорывается вторая жаберная щель, а на стадии 55—56 ч развития формируется третья. Четвертая жаберная щель у эмбриона курицы редуцирована до маленькой ямки. Между жаберными щелями располагаются аркообразные утолщения — жаберные дуги. Дорсальнее жаберных дуг расположен слуховой пузырек. Самый большой отдел головного мозга на этой стадии развития — по-прежнему средний мозг, но краниальнее закладки глаза начался процесс формирования полушарий головного мозга.

Дополнительное задание. Вскрытие куриного яйца на стадии 4 суток инкубации и приготовление временного тотального препарата приведены в разделе «Птицы. Работа с живым материалом (развитие эмбриона курицы)».

Особенность эмбрионального развития млекопитающих состоит в том, что оно происходит в материнском организме и зависит от его внутренней среды. Внутренние органы половой системы самок млекопитающих состоят из двух яичников, двух яйцеводов (у человека их называют маточными, или фаллопиевыми, трубами) и матки, строение которой имеет видовую специфику. Яйцеводы представляют собой извитые полые трубки, соединенные с одной стороны с маткой, а с другой имеющие воронку, раскрытую в сторону яичника (рис. 64). Изнутри яйцеводы выстланы мерцательным эпителием, который создает ток жидкости в направ-

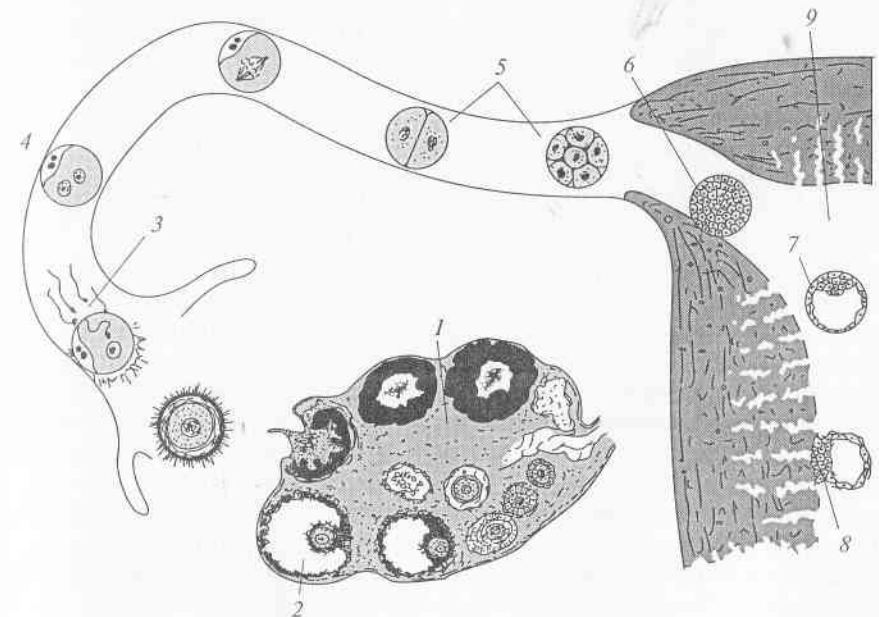


Рис. 64. Раннее развитие эмбриона человека:

1 — яичник; 2 — преовуляторный фолликул; 3 — овулировавший ооцит оплодотворяется в ампулярной части яйцевода; 4 — стадия пронуклеусов; 5 — дробление (стадии 2 и 8 blastомеров); 6 — морула; 7 — бластоциста; 8 — начало имплантации; 9 — полость матки

лении от воронки яйцевода к матке. После овуляции яйцеклетка, окруженная фолликулярными клетками кумулюса, попадает в воронку яйцевода с током жидкости и оказывается в *ампулярной части яйцевода*, где и происходит оплодотворение. У большинства млекопитающих оно совершается на метафазе второго деления созревания. Исключение составляют лиса, собака и лошадь, у которых оплодотворение приходится на метафазу первого деления созревания. Размер доимплантационных эмбрионов млекопитающих составляет от 70 до 130—150 мкм.

Эмбрион млекопитающих от стадии зиготы и до стадии двухслойной бластоцисты свободно плавает в жидкости, которая заполняет полость яйцеводов и матки, и по мере развития спускается вниз по яйцеводу благодаря нисходящему току жидкости и перистальтическому сокращению мышечных клеток матки.

В период до начала имплантации эмбрион проходит ряд стадий развития (время их наступления у мыши показано на рис. 65):

- 1) дробление (2—16 бластомеров);
- 2) компактизацию (16—32 бластомеров);
- 3) кавитацию и формирование бластоцисты (64 бластомера).

Для плацентарных млекопитающих характерно *полное (голобластическое) равномерное ротационное асинхронное дробление*. Асинхронность проявляется начиная со второго деления дробления: первые два бластомера делятся не одновременно. Несмотря на это, клетки эмбрионов млекопитающих до стадии 8 бластомеров сохраняют *тотипотентность*, т.е. способность сформировать все органы и ткани организма. Если, например, эмбрион мыши на стадиях 2 или 4 бластомеров разделить на отдельные клетки, то из каждой может развиваться нормальный эмбрион.

Другой особенностью млекопитающих является большая продолжительность первых клеточных циклов развития. Так, у мыши из 19 суток эмбрионального развития период дробления занимает 3 дня (см. рис. 65). Отсутствие характерных для дробления других животных укороченных клеточных циклов связано с тем, что у млекопитающих собственный геном активируется начиная со стадии двух бластомеров. Первой начинается транскрипция генов, которые кодируют белки теплового шока. Считается, что эти белки участвуют в активации генома зародыша. Далее включаются гены, кодирующие белки митотического веретена, а также гены, кодирующие ряд других белков, необходимых для клеточного деления, и гены некоторых ростовых факторов.

Со стадии 16 бластомеров эмбрион называют *морулой*. Вначале все клетки морулы имеют округлую форму и почти не связаны друг с другом (рис. 66, А). Такой эмбрион называют *некомпактизированной морулой*. На стадии 16—32 бластомеров происходит *компактизация* — процесс формирования специализированных контактов и более плотной упаковки клеток (рис. 66, Б). Эмбрион на

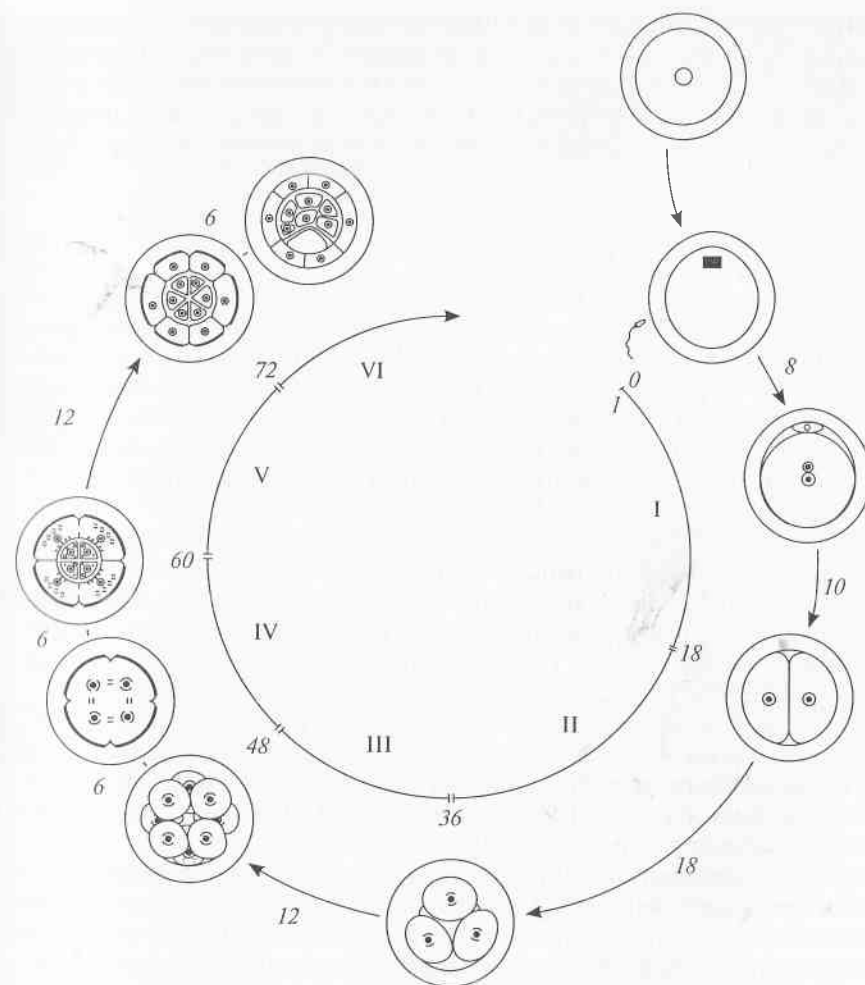


Рис. 65. Время наступления событий в доимплантационном развитии мыши.

Римскими цифрами обозначены клеточные циклы дробления; внутренний круг — часы после оплодотворения; внешний круг — интервалы между последующими делениями

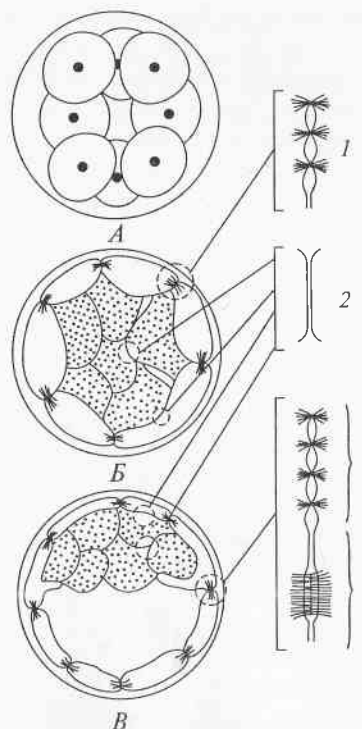
этой стадии состоит из двух клеточных субпопуляций с различной последующей судьбой: внутренних клеток и наружных клеток, контактирующих с внешней средой. В конце 16-клеточной стадии внешние бластомеры уплощаются и более тесно контактируют между собой. В начальный период компактизации этот процесс обратим: в среде, не содержащей Ca^{2+} , бластомеры снова приобретают округлую форму и эмбрион декомпактизируется. Это происходит потому, что ранний этап компактизации происходит

Рис. 66. Компактизация — формирование специализированных контактов между клетками эмбриона:

А — 8-клеточный зародыш до компактизации; В — компактизированная морула (примерно 16—32 клеток); В — бластоциста (64 клетки и более); 1 — плотные контакты; 2 — щелевые контакты; 3 — десмосомы

за счет появления на поверхности бластомеров *увоморулина* — белка из семейства кадгеринов, кальцийзависимых молекул клеточной мембраны. Молекулы увоморулина соседних клеток связываются между собой и вызывают их компактизацию. В результате все молекулы увоморулина оказываются сконцентрированными на тех поверхностях клеток эмбриона, которые контактируют с соседними клетками. Позже между соседними клетками образуются щелевые контакты.

Увоморулин — трансмембранный белок, и его цитоплазматический



участок связывается с кортикальными белками катенинами, медиаторами взаимодействия увоморулина с белками цитоскелетного комплекса. В результате происходит регионализация поверхностной мембраны внешних бластомеров на апикальный (внешний) и базолатеральный (внутренний) отделы, а на их границе формируются зоны плотных контактов (рис. 66, В). Одновременно во внешних бластомерах происходит перераспределение клеточных органелл: на внешней поверхности появляются микроворсинки, элементы комплекса Гольджи и митохондрии мигрируют в апикальную (внешнюю) часть клеток, а ядра смещаются в базальную (внутреннюю) часть цитоплазмы. На этой стадии в контактных зонах внешних клеток образуются десмосомы (рис. 66, В), во внешних бластомерах — система активного транспорта ионов, глюкозы и воды внутрь эмбриона, вода накапливается между клетками и образуется полость. Этот процесс называется *кавитацией*, а эмбрион на этой стадии развития у млекопитающих называют *бластоцистой*.

Бластоциста мыши на стадии 3,5 суток развития состоит из 60—70 клеток и представляет собой пузырек, состоящий из стенки (*трофэктодермы*), полости, заполненной жидкостью, и скопления клеток на одной из сторон внутренней поверхности троф-

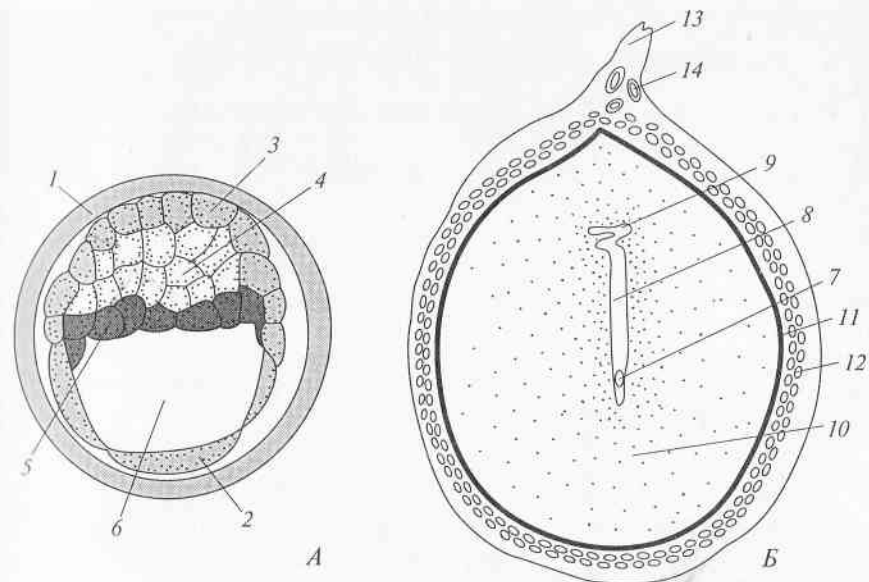


Рис. 67. Строение (А) и имплантация (В) бластоцисты у мыши:

1 — прозрачная оболочка; 2 — муральная трофэктодерма; 3 — полярная трофэктодерма; 4 — эпибласт; 5 — гипобласт; 6 — бластоцель; 7 — имплантирующаяся бластоциста в маточной крипте; 8 — крипта; 9 — полость матки; 10 — эндометрий; 11 — внутренний слой миометрия (кольцевой); 12 — наружный слой миометрия (продольный); 13 — мезентерий; 14 — крупные маточные сосуды

эктодермы (*внутренней клеточной массы*). Клетки внутренней клеточной массы (их количество — 15—20) связаны между собой только щелевыми контактами.

У бластоциста на стадии 4,5 суток развития внутренняя клеточная масса разделяется на две клеточные линии. Клетки ВКМ, контактирующие с полостью бластоцеля, образуют *гипобласт*, или *первичную энтодерму*, а остальные становятся *эпибластом*, или *первичной эктодермой* (рис. 67, А). У эмбриона мыши из клеток трофэктодермы в дальнейшем образуются гигантские клетки трофобласта, а из гипобласта — часть внезародышевой энтодермы. Все остальные зародышевые и внезародышевые ткани эмбриона формируются из эпибласта.

На 5-е сутки развития бластоциста мыши выходит из прозрачной оболочки и имплантируется, погружаясь в глубокую маточную крипту областью бластоцеля вперед. Клетки трофэктодермы вступают в контакт с эпителием маточной крипты и начинают разрушать его, а в маточном эндометрии формируется ответ на инвазию эмбриона — *децидуальная реакция*.

Препараты к занятию «Раннее развитие млекопитающих»

Студентам предлагаются препараты эмбрионов мыши на разных стадиях развития, начиная со стадии пронуклеусов и до начала имплантации. Преподаватель может выбрать демонстрационный материал между гистологическими срезами яйцеводов и матки мыши на соответствующих стадиях беременности (первый вариант) и гистологическими срезами отдельных эмбрионов (второй вариант). Первый вариант дает возможность рассмотреть не только эмбрион в целом, но и окружающие его ткани половой системы самки. Второй вариант удобен для более детального изучения строения эмбриона при большом увеличении микроскопа.

Препарат № 1. Зиготы в ампулярной части яйцевода: гистологический срез яйцевода мыши на сроке беременности 0,5 суток

Задание. Найдите на препарате при малом увеличении микроскопа ампулярную часть яйцевода. Переведите микроскоп на большее увеличение и зарисуйте стенку ампулы и зиготы, окруженные кумулюсными клетками. Обратите внимание на различия в строении стенки ампулы (рис. 68) от других участков яйцевода (рис. 69).



Рис. 68. Зиготы в ампулярной части яйцевода мыши:

1 — яичник; 2 — капсула яичника; 3 — связка яйцевода; 4 — полость яйцевода;
5 — зиготы, окруженные клетками кумулюса

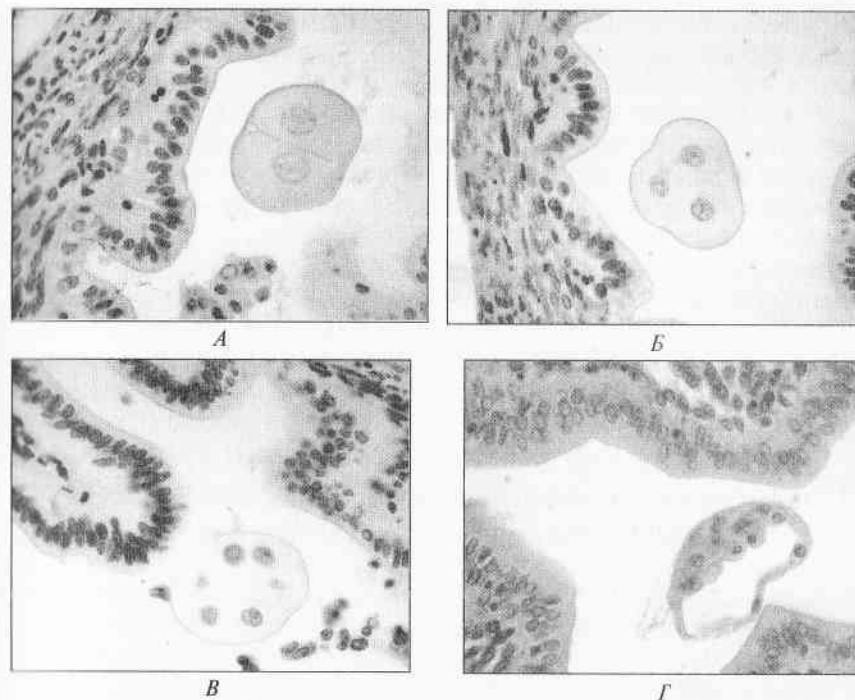


Рис. 69. Дробящийся эмбрион мыши в полости яйцевода на стадиях 2, 4 и 8 бластомеров (А—В) и бластоциста в полости матки (Г)

Данный препарат представляет собой гистологический срез, прошедший через яичник и петли яйцевода. На малом увеличении (объектив $\times 8$) найдите среди срезов петель яйцевода его ампулярную часть (см. рис. 68). В первый день беременности ампулярная часть расширена и на поперечном срезе имеет больший диаметр, чем другие части яйцевода. Как правило, ампулярная часть яйцевода (4) на срезе лежит рядом с яичником (1), а мезентериальная связка ампулы (3) переходит в соединительнотканную капсулу яйцевода (2). У мыши (в отличие от человека) яичник окружен капсулой — тонкой полупрозрачной оболочкой. Петли яйцевода лежат рядом с капсулой, а воронка яйцевода открывается под капсулу. При овуляции ооциты также оказываются под капсулой яичника и втягиваются в воронку яйцевода током жидкости, который создают реснички эпителия воронки и перистальтические сокращения яйцевода.

Зиготы, лежащие внутри ампулы, окружены клетками кумулюса. После овуляции и оплодотворения клетки кумулюса ослизняются и зиготы оказываются заключенными в плотный комочек из слизи и кумулюсных клеток. В течение первого дня беременно-

сти зиготы теряют контакт с клетками кумулюса и комок клеток понемногу рассыпается. В этот период зигота мыши находится на стадии пронуклеусов, но на гистологических препаратах их, как правило, не видно. Если срез прошел удачно, то под прозрачной оболочкой можно увидеть одно из двух редукционных тельц. Первое и второе редукционные тельца у мыши практически одинакового размера и не отличаются друг от друга. Первое редукционное тельце у мыши еще раз не делится.

Если на гистологическом срезе попал яичник, то на этой стадии можно увидеть самые начальные этапы дифференцировки желтых тел, которые формируются на месте овулировавших фолликулов из клеток гранулезы и клеток текальной оболочки фолликула.

Препарат № 2. Эмбрионы мыши на стадиях дробления: гистологический срез яйцевода мыши на сроке беременности 1,5—2,5 суток

Задание. Просмотрите препарат при малом увеличении микроскопа и найдите эмбрионы на стадии дробления, лежащие в полости извитого яйцевода. Переведите микроскоп на большее увеличение и зарисуйте эмбрион и участок стенки яйцевода. Подсчитайте, сколько клеток эмбриона видно на срезе, и определите стадию развития.

На рис. 69, А—В представлены эмбрионы на стадиях 2, 4 и 8 бластомеров. На гистологическом срезе видны не все бластомеры, составляющие эмбрион на этих стадиях развития, так как эмбрион размером около 70 мкм попадает на несколько гистологических срезов толщиной 7—10 мкм. На гистологических препаратах оболочка эмбрионов (*zona pellucida*) плотно прилегает к бластомерам и видна как тонкий ободок, более темный, чем прилегающая цитоплазма. Перивителлиновое пространство можно заметить только на ранних стадиях дробления с внешней стороны соседствующих бластомеров (рис. 69, А).

Препарат № 3. Бластоциста в полости матки: гистологический срез матки мыши на сроке беременности 4 суток

Задание. Просмотрите препарат при малом увеличении микроскопа и найдите бластоцисту, располагающуюся в полости рога матки. Переведите микроскоп на большее увеличение и зарисуйте бластоцисту. На рисунке укажите трофэктодерму, внутреннюю

клеточную массу (ВКМ) и полость бластоцисты. В области ВКМ обозначьте эпибласт (первичную эктодерму) и гипобласт (первичную энтодерму).

У мыши фолликулы обычно созревают в обоих яичниках и одновременно овулируют 6—12 ооцитов. Эмбрионы на стадии 4,5 суток развития равномерно распределены по длине рогов полости матки. Для студенческого практикума обычно изготавливаются продольные гистологические срезы рога матки и на одном препарате можно найти в полости матки несколько бластоцист. Из них следует выбрать бластоцисту, которая срезана меридионально и на которой видна не только трофэктодерма, но и ВКМ.

Бластоциста в возрасте 4—4,5 суток (рис. 69, Г) уже вышла из прозрачной оболочки, в области ВКМ хорошо различимы эпибласт и гипобласт. Полость бластоцисты окружена только клетками трофэктодермы, а клетки гипобласта еще не начали обростать ее изнутри.

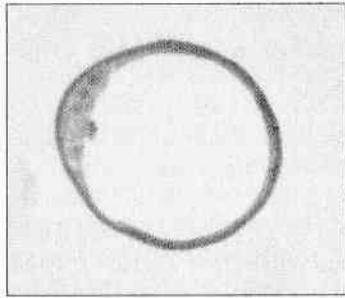
Препарат № 4. Бластоциста мыши на стадии 3,5—4,5 суток развития: полутонкий срез

Задание. Просмотрите препарат при малом увеличении микроскопа, найдите срез бластоцисты, переведите микроскоп на большее увеличение и зарисуйте бластоцисту. На рисунке укажите трофэктодерму, внутреннюю клеточную массу (ВКМ) и полость бластоцисты. В области ВКМ обозначьте эпибласт (первичную эктодерму) и гипобласт (первичную энтодерму).

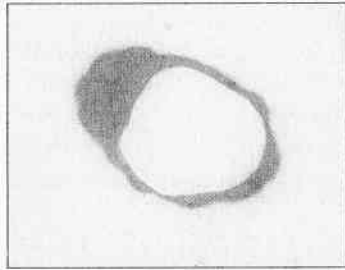
Препарат может быть предложен для ознакомления со строением бластоцисты вместо препарата 3. Полутонкие срезы (толщиной 1—2 мкм) получаются при использовании твердой заливочной среды, например эпон. На таких срезах (рис. 70, А, Б) при большом увеличении микроскопа хорошо различимы детали строения клеток, например расположение ядер клеток трофэктодермы.

Препарат № 5. Бластоциста мыши на стадии 3,5 суток развития: суховоздушный препарат

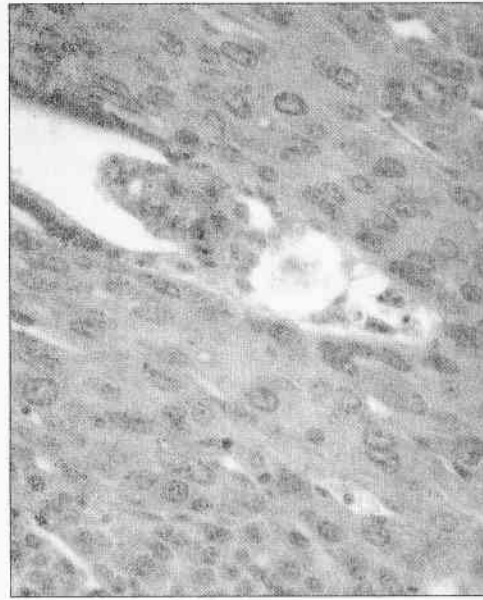
Задание. Просмотрите препарат при малом увеличении микроскопа и найдите место, где находятся распластанные ядра клеток бластоцисты (рис. 71). Переведите микроскоп на большее увеличение и зарисуйте препарат. Подсчитайте количество интерфазных ядер и митотических пластинок. Подсчитайте митотический индекс (МИ) данной бластоцисты по формуле:



A



B



V

Рис. 70. Последовательные стадии развития бластоцисты мыши:

A — бластоциста 3,5 суток развития, окруженная прозрачной оболочкой; B — бластоциста 4,5 суток развития после вылупления из прозрачной оболочки; B — бластоциста 5,5 суток развития в маточной крипте (начало имплантации)

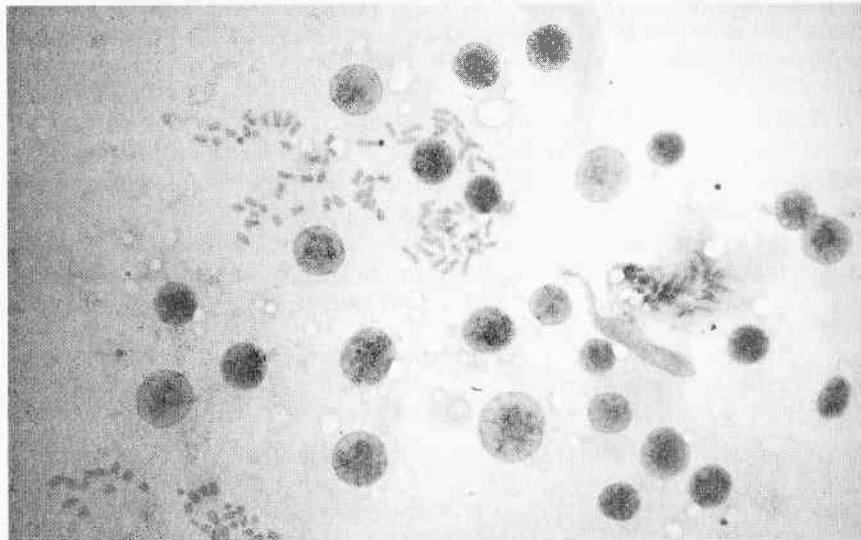


Рис. 71. Бластоциста мыши на суховоздушном препарате: видны ядра интерфазных клеток и митотические пластинки

МИ = число пластинок / общее число клеток в бластоцисте, где общее число клеток соответствует сумме интерфазных ядер и митотических пластинок.

Суховоздушные препараты бластоцист готовят по методике, предложенной А.Тарковским (1961), или по одной из ее модификаций. Для получения таких препаратов бластоцисты экспонируют в гипотоническом растворе до тех пор, пока их клетки не будут разрушены. Потом их переносят на обезжиренное предметное стекло в микрокапле гипотонического раствора и обрабатывают спирто-уксусным фиксатором, который приливается по капле (5—7 капель). В результате прозрачная оболочка бластоцисты лопается и ядра интерфазных клеток и митотические пластинки расплываются по стеклу.

Суховоздушные препараты ранних эмбрионов используются как для определения состояния эмбриона после каких-либо экспериментальных воздействий, так и для получения митотических пластинок и кариотипирования эмбрионов.

Препарат № 6. Начало имплантации: бластоциста на стадии 5—5,5 суток развития в маточной крипте: гистологический срез матки мыши

Задание. Просмотрите препарат при малом увеличении микроскопа и найдите бластоцисту, лежащую в маточной крипте. Переведите микроскоп на большее увеличение и зарисуйте бластоцисту и окружающие ее ткани матки. На рисунке укажите трофэктодерму, эпибласт (первичную эктодерму) и гипобласт (первичную энтодерму).

Имплантация у мыши происходит в глубоком кармане, образованном тканями матки, в так называемой имплантационной крипте. Клетки трофэктодермы (трофобласта), обладающие фагоцитарной активностью, разрушают эпителий, выстилающий полость маточной крипты, и индуцируют в маточном эндометрии децидуальную реакцию. На препарате (см. рис. 70, B) часть эпителия крипты уже разрушена и в клетках видны вакуоли с фагоцитированными фрагментами клеток. Вокруг места имплантации располагаются более крупные клетки, чем те, которые составляют основную массу эндометрия — это децидуальные клетки (см. задание «Плаценты»).

ПЛАЦЕНТЫ

Продолжением имплантации является процесс образования плаценты — плацентация. Плацента — провизорный орган, который формируется во время беременности, в ее построении участвуют как эмбриональные, так и материнские ткани. Через плаценту осуществляется связь зародыша с материнским организмом. Функции плаценты, обеспечивающие нормальное развитие зародыша, многообразны: трофика и газообмен, защитная, регуляторная, гормональная, антиоксидантная и т. д. Основная функция плаценты заключается в передаче веществ, растворенных в крови матери, эмбриону и наоборот. Питательные вещества диффундируют из крови матери в кровь эмбриона, а конечные продукты обмена веществ плода диффундируют в кровь матери и выводятся ее выделительной системой. Через плаценту осуществляется газообмен: кислород поступает от матери к эмбриону, а углекислый газ — от эмбриона к матери. Кроме того, плаценты многих млекопитающих вырабатывают гормоны, которые способствуют сохранению беременности (у человека это хорионический гонадотропин). При рождении плода плацента отторгается.

У разных представителей плацентарных млекопитающих строение плаценты неодинаково. Иногда плаценты различных видов млекопитающих классифицируют по их анатомическому строению. При этом учитывается форма плаценты и расположение на ней ворсин хориона. По этим признакам выделяют четыре типа плацент (классификация по О. Гертвигу):

- 1) *диффузная плацента*, для которой характерно образование ворсин по всей поверхности хориона (рис. 72, А);
- 2) *множественная плацента* — хориальные ворсины представлены группами, границами между ними являются участки гладкого хориона (рис. 72, Б);
- 3) *зонарная плацента* — ворсинки хориона располагаются, как бы опоясывая плод (рис. 72, В);
- 4) *дискоидальная плацента* — хориальные ворсины сконцентрированы в одном участке хориона; характерна для грызунов, приматов и человека (рис. 72, Г).

Однако чаще при классификации плацент используют другой подход — гистологический. В основу его положена степень сближения хориона с материнским кровеносным руслом.

Кровоток плода и кровоток матери никогда не смешиваются: их разделяет несколько слоев эмбриональной и материнской ткани, которые образуют так называемый гемоплацентарный барьер. Он обеспечивает селективный обмен растворенными веществами между системами кровообращения материнского организма и плода, используя гистологический подход. Плаценты разных видов млекопитающих подразделяют на четыре типа, в зависимости от количества слоев, разделяющих кровоток матери и плода:

- 1) *эпителиохориальные плаценты* — материнские ткани не разрушаются, а ворсины хориона только прилегают к углублениям слизистой оболочки матки (свиньи, лошади и др.) (рис. 73, А);
- 2) *синдесмохориальные плаценты* — ворсины хориона разрушают эпителий матки и вторгаются в соединительную ткань слизистой оболочки матки (жвачные животные) (рис. 73, Б);
- 3) *эндотелиохориальные плаценты* — ворсины контактируют с эндотелием кровеносных сосудов слизистой матки (хищники) (рис. 73, В);
- 4) *гемохориальные плаценты* — ворсины хориона соприкасаются непосредственно с материнской кровью; разветвленная сеть ворсин расположена в межворсинчатых пространствах, заполненных несвертывающейся кровью матери, т. е. осуществляется наиболее совершенный контакт между плодом и материнским организмом (грызуны, насекомоядные, обезьяны и человек) (рис. 73, Г).

В плацентах второго — четвертого типов клетки трофобласта вырабатывают протеолитические ферменты, которые разрушают прилежащие маточные ткани. Глубина проникновения клеток трофобласта в глубь материнских тканей зависит от митотической активности и протеолитической активности клеток трофобласта, а

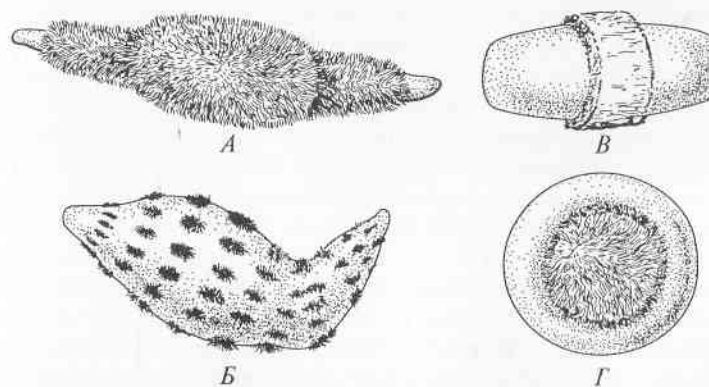


Рис. 72. Типы плацент (классификация по анатомическому строению): А — диффузная плацента свиньи; Б — множественная (котиледонная) плацента коровы; В — зонарная плацента собаки; Г — дискоидальная плацента человека. На рисунке показаны только плодные ткани

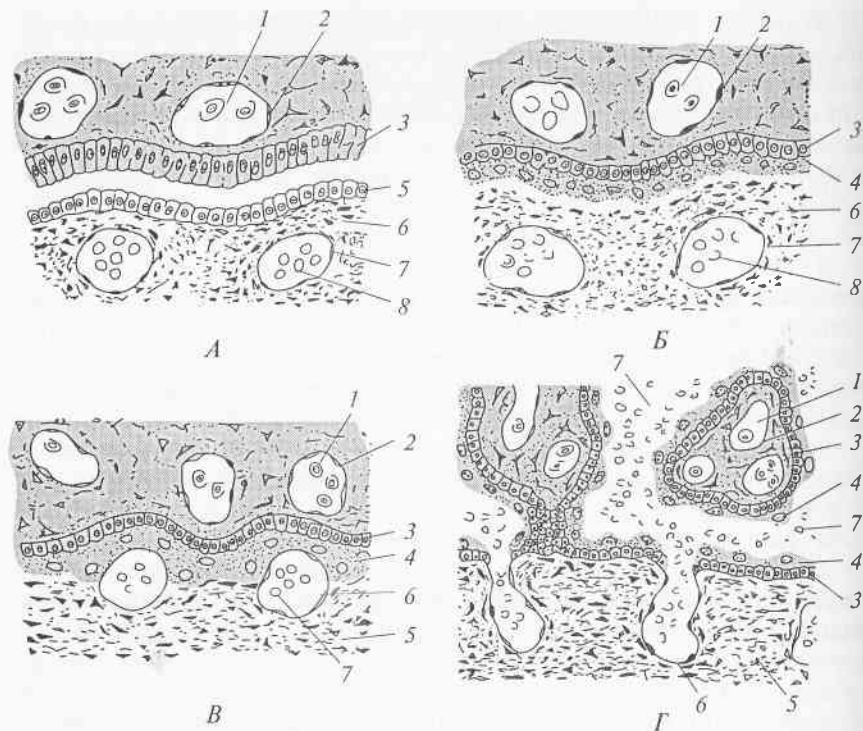


Рис. 73. Типы плацент (классификация по гистологическому строению, серым фоном обозначена плодная часть плаценты):

А — эпителиохориальная; Б — синдесмохориальная; В — эндтелиохориальная; Г — гемохориальная: 1 — клетки крови плода; 2 — эндотелий кровеносных сосудов плода; 3 — цитотрофобласт; 4 — синцитиотрофобласт; 5 — маточный эпителий; 6 — маточный эндометрий; 7 — эндотелий кровеносных сосудов маточного эндометрия; 8 — клетки крови матери

также от их способности мигрировать в глубь материнских тканей на ранних этапах формирования плаценты.

Клетки трофобласта вырабатывают сходные с пепсином гликопротеины, характерные для беременности (PAG — pregnancy-associated glycoproteins). Так, например, у жвачных в клетках трофобласта экспрессируется около 100 генов, кодирующих белки этой группы, и в результате экзоцитоза везикул, содержащих PAG. По крайней мере часть этих молекул имеет высокую протеиназную активность и разрушает окружающие материнские клетки, а другая часть выполняет барьерную функцию, связывая белки, выделяемые материнскими клетками. Белки группы PAG вырабатываются и в трофобласте *эпителиохориальной плаценты* свиньи, но, по-видимому, они не экзоцитируются в количестве, достаточном для разрушения окружающих материнских тканей.

В случае *синдесмохориальных плацент* (жвачные) клетки трофобласта не проходят глубоко в материнские ткани, так как довольно быстро устанавливаются специализированные плотные контакты с окружающими материнскими клетками и теряют мобильность (рис. 74). Клетки трофобласта, которые мигрируют в материнские ткани, являются двух- и трехъядерными, но формирование единого слоя синцитиотрофобласта, как в случае гемохориальной плаценты человека, не происходит.

В случае *гемохориальных плацент* у приматов и человека слой синцитиотрофобласта, обладающий высокой протеолитической и фагоцитарной активностью, разрушает не только маточный эндотелий и лежащую под ним децидуальную ткань, но и стенки кровеносных сосудов, которыми пронизан эндометрий.

В гемохориальных плацентах грызунов синцитий не формируется и все клетки трофобласта сохраняют свою индивидуальность, но для них также характерны высокий уровень протеолитической и фагоцитарной активности, а на начальных этапах формирования плаценты — активная миграция в глубь материнских тканей. В результате в обоих случаях кровь матери контактирует непосредственно с поверхностью хориона и от кровотока эмбриона ее отделяют только эмбриональные ткани.

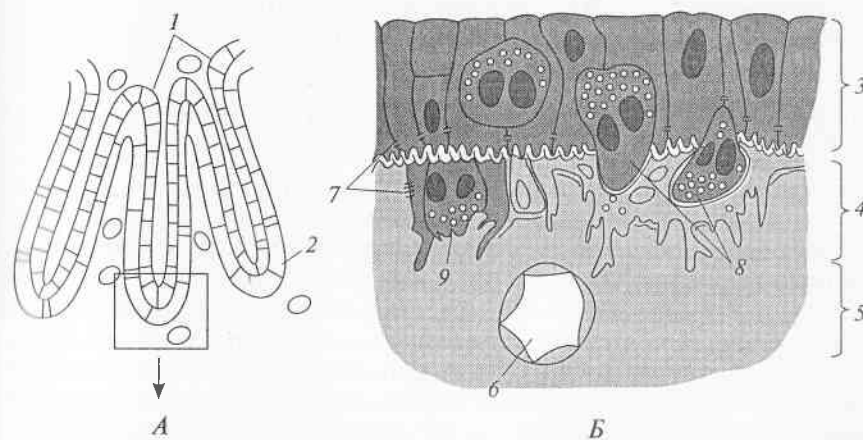


Рис. 74. Строение синдесмохориальной плаценты жвачных животных:

А — расположение ворсин хориона в криптах матки; Б — разрушение маточного эпителия двуядерными клетками хориона; 1 — ворсинки хориона; 2 — маточная крипта; 3 — слой трофобласта; 4 — маточный эпителий; 5 — маточный эндометрий; 6 — кровеносный сосуд в эндометрии; 7 — плотные контакты, которые клетки трофобласта образуют между собой и с клетками маточного эпителия; 8 — двуядерные клетки трофобласта, мигрирующие в слой маточного эпителия

По степени повреждения материнских тканей при родах все типы плацент подразделяют на *отпадающие* (или *децидуальные*) и *неотпадающие*.

Для свиней, лошадей, верблюдов, многих жвачных животных, ламуров и некоторых других видов плацентарных млекопитающих характерна неотпадающая плацента, состоящая только из плодных тканей. При родах ворсины хориона выходят из углублений в слизистой оболочке матки, не повреждая ее, без кровотечения.

Для хищных, грызунов, насекомоядных, рукокрылых, приматов и человека характерны плаценты отпадающего (децидуального) типа. В состав такой плаценты входят как плодные, так и материнские ткани. При родах происходит так называемое *отторжение плаценты* — вместе с ворсинами хориона отторгается и часть слизистой оболочки матки, что вызывает довольно значительное кровотечение.

В случаях формирования децидуальной плаценты маточный эндометрий реагирует на имплантацию эмбриона — в нем развивается *децидуальная реакция*. Клетки эндометрия, расположенные вокруг места имплантации, начинают активно делиться. Позднее плоидность децидуальных клеток увеличивается (например, у крыс — до 64С) и они приобретают способность к фагоцитозу. На ранних этапах имплантации децидуальная ткань противостоит инвазивной активности клеток трофобласта, а в процессе плацентации часть ее входит в состав плаценты.

На этом занятии рассмотрим два крайних, наиболее сильно различающихся варианта плацент: эпителиохориальную плаценту свиньи и гемохориальную плаценту человека.

Плацента свиньи

Формирование плодных оболочек свиньи во многом сходно с формированием плодных оболочек у птиц (цв. вкл. VI, А, Б).

На поверхности хориона образуются первичные, а потом вторичные ворсинки хориона, которые, разрастаясь, внедряются в образующиеся крипты — углубления слизистой оболочки матки. Хорион срастается с аллантаисом и формирует плаценту. Площадь поверхности плаценты свиньи очень велика. Это достигается как за счет ее анатомического строения (рис. 75), так и за счет многочисленных диффузно расположенных ворсин хориона (см. рис. 72). Так как между кровотоком плода и матери в эпителиохориальной плаценте свиньи большое число слоев клеток, то для нормального протекания процессов газообмена, питания зародыша и выведения продуктов его жизнедеятельности нужна максимальная площадь контакта хориона с маточным эпителием.

Схема цитологического строения плаценты свиньи представлена на рис. 76.

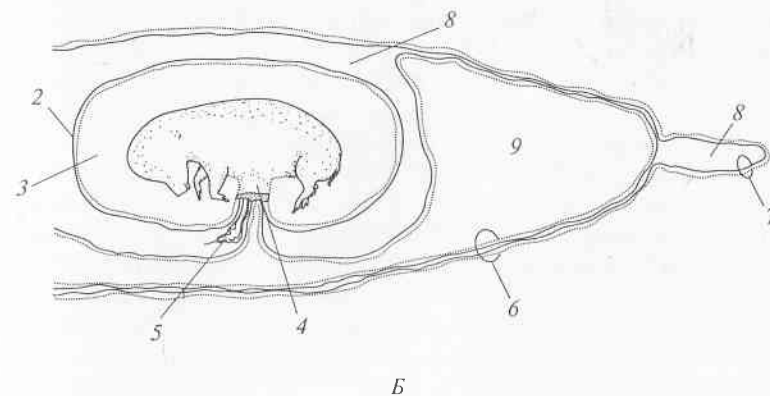
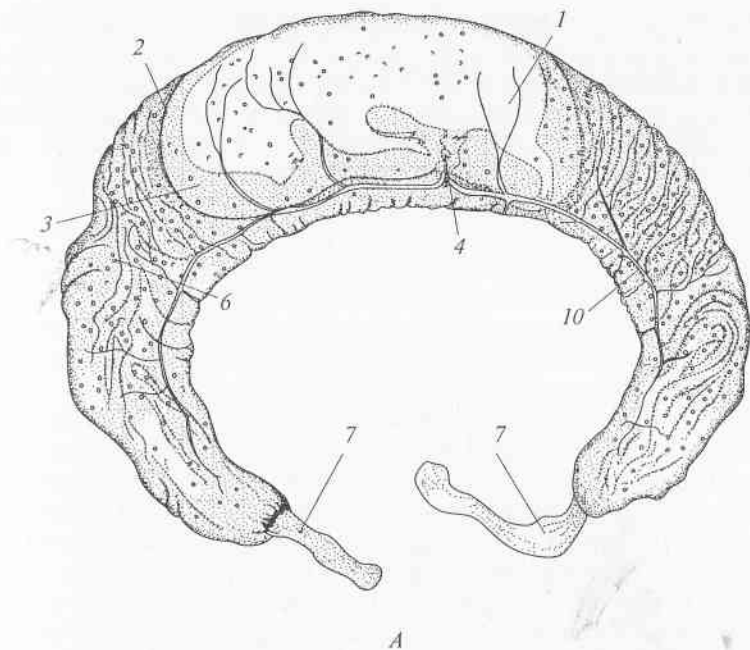


Рис. 75. Строение плодных оболочек свиньи:

А — общий вид; Б — схема строения в сагиттальной проекции; 1 — эмбрион свиньи внутри плодных оболочек; 2 — стенка амниона; 3 — амниотическая полость; 4 — пуповина; 5 — желточный мешок; 6 — часть плодных оболочек, где аллантаис подстилает хорион — место формирования плаценты; 7 — концевые зоны плодных оболочек (образованы только хорионом); 8 — внезародышевый целом (экзоцелом); 9 — полость аллантаиса; 10 — сосуды аллантаиса (производные висцерального листка внезародышевой мезодермы)

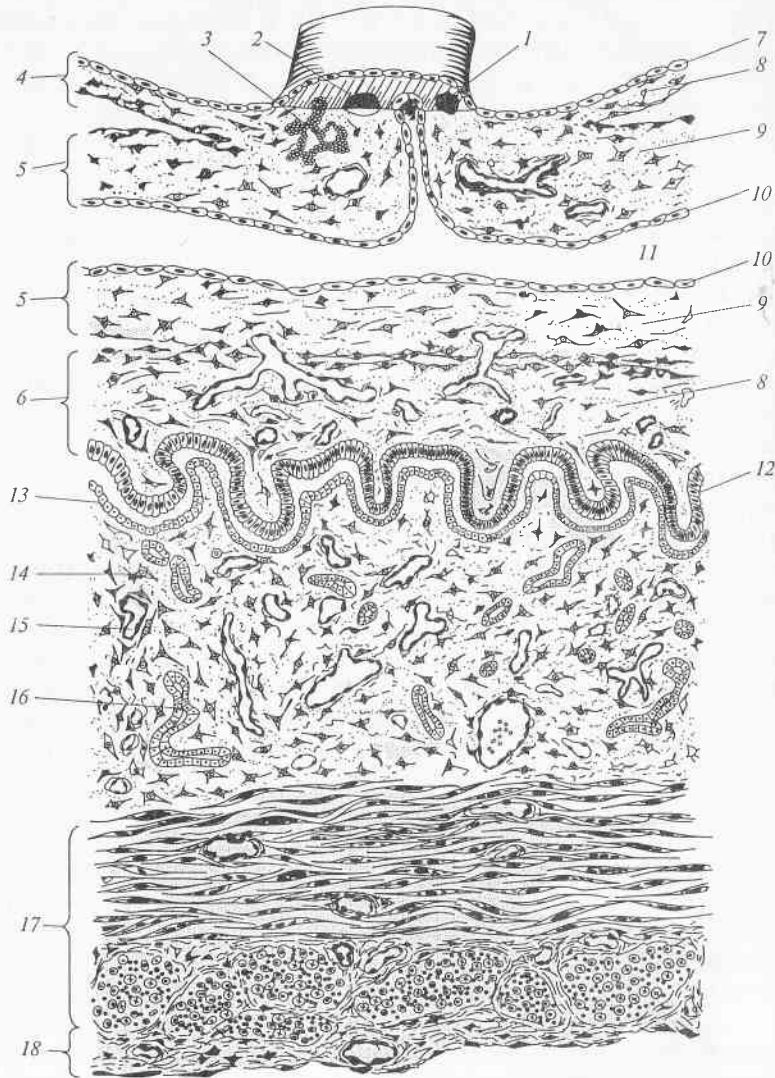


Рис. 76. Строение эпителиохориальной плаценты свиньи и ее взаимодействие с тканями матки:

1 — артерия аллантаоиса; 2 — вена аллантаоиса; 3 — рудимент желточного мешка; 4 — стенка амниона; 5 — стенка аллантаоиса; 6 — стенка хориона; 7 — эктодерма; 8 — париетальная мезодерма; 9 — висцеральная мезодерма; 10 — энтодерма; 11 — полость аллантаоиса; 12 — трофэктодерма; 13 — маточный эпителий; 14 — эндометрий; 15 — кровеносный сосуд эндометрия; 16 — маточная железа; 17 — мышечные слои матки; 18 — серозная оболочка матки

При традиционном рассмотрении микроскопического строения плаценты человека принято выделять ее детскую и материнскую части. Под первой подразумевают преимущественно ворсинки хориона, а материнская часть представлена децидуальной тканью и материнской кровью, циркулирующей в сосудах децидуальной оболочки и гемохориальном пространстве.

Плацента человека отличается отсутствием энтодермального слоя. Внезародышевая энтодерма входит в состав только ножки аллантаоиса, внутренняя полость аллантаоиса сильно редуцирована, а основная его часть — разросшаяся и сильно васкуляризированная мезодерма, по своему происхождению это висцеральная латеральная внезародышевая мезодерма (цв. вкл. VI, B). Базальную часть децидуальной оболочки с отходящими от нее перегородками формирует материнскую часть плаценты.

Плодная часть плаценты: формирование ворсинок хориона. Формирование ворсин хориона, составляющих плодную часть плаценты, проходит в три этапа.

Первый этап. Бластоциста на стадии 7—9 дней развития оседает на поверхности маточного эпителия (см. рис. 64). Клетки трофобласта лизируют эпителий, и бластоциста начинает погружаться в толщу эндометрия. На 11—12-й день развития она полностью погружается в глубь эндометрия и дефект в стенке матки закрывается пролиферирующим эпителием. В начале имплантации трофобласт состоит из отдельных клеток. Такой слой, состоящий из отдельных клеток, называют *цитотрофобластом*. По мере погружения трофобласт бластоцисты разрастается и становится многослойным, клетки его наружного слоя сливаются и формируют многоядерное образование — *синцитиотрофобласт*. Ворсинки хориона, состоящие только из клеток трофобласта, называют *первичными*. Цитотрофобласт подстилает слой синцитиотрофобласта и является источником клеток во время формирования и роста плаценты (рис. 77, A). Синцитиотрофобласт обладает высокой протеолитической активностью. В результате распада эндометрия под влиянием протеолитических ферментов формируется *эмбриотроф*, который резорбируется, фагоцитируется синцитиотрофобластом и используется для питания зародыша. Первичные ворсинки обращены в полости — лакуны, возникающие на месте распада сосудов и соединительной ткани эндометрия. Совокупность этих лакун образует межворсинчатое пространство, заполненное кровью матери из сосудов базальной части децидуальной оболочки. Весь этот процесс называется *имплантацией*.

Второй этап. К 12—13-му дню развития зародыша, в начале процесса гастрюляции, в первичные ворсинки врастают клетки внезародышевой мезодермы — формируются вторичные ворсинки хо-

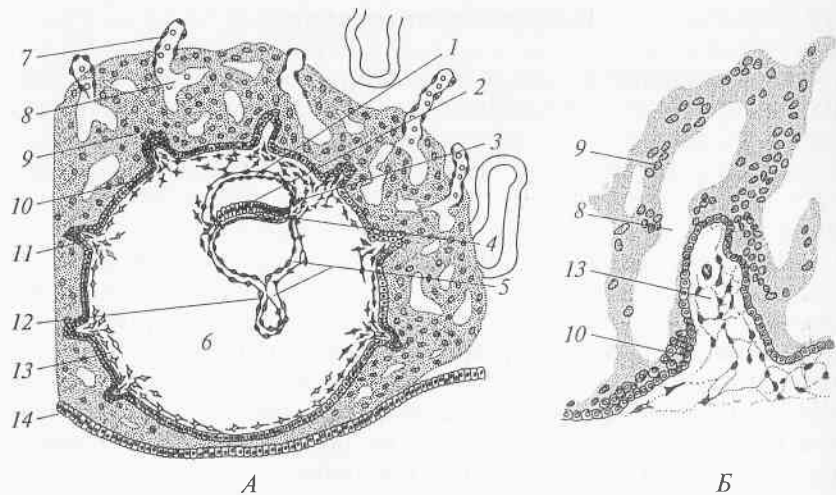


Рис. 77. Формирование ворсин хориона у человека:

А — начало формирования ворсин (эмбрион в возрасте 13 суток); Б — вторичная ворсина; 1 — амнион; 2 — зародышевый диск; 3 — внезародышевая мезодерма (мигрирует через заднюю часть первичной полоски); 4 — зачаток аллантаиса; 5 — желточный мешок; 6 — экзоцелом; 7 — материнский кровеносный сосуд; 8 — лакуна трофобласта; 9 — синцитиотрофобласт; 10 — цитотрофобласт; 11 — первичная ворсина хориона; 12 — висцеральная внезародышевая мезодерма (входит в состав желточного мешка и аллантаиса); 13 — париетальная внезародышевая мезодерма (входит в состав амниона и хориона); 14 — эпителий матки

риона (рис. 77, Б). По своему происхождению эта мезодерма, высеившаяся во внезародышевую область через заднюю часть первичной полоски эмбриона, является париетальной латеральной мезодермой и формирует неваккуляризованную мезенхимную основу ворсины. Такая ворсина, состоящая из синцитио- и цитотрофобласта и подстилающей их мезенхимы, называется *вторичной ворсиной хориона*, а весь этап соответствует периоду формирования наружной внезародышевой оболочки эмбриона — *хориона (серозы)*.

Третий этап. На 3-й неделе развития зародыша *аллантаис* прирастает к хориону и в строму вторичных ворсин начинают вращать сосуды (плодные капилляры) — образуются *третичные ворсины хориона* (рис. 78, А). Этот процесс называют *плацентацией*. Трофобласт третичной ворсины состоит из двух слоев. Наружный его слой образован синцитием, внутренний — цитотрофобластом (клетки Лангханса), расположенным на базальной мембране, отделяющей трофобласт от стромы ворсины. Синцитий представляет собой непрерывный слой цитоплазмы с располагающимися в один ряд овальными или округлыми ядрами. Поверхность синци-

тия покрыта многочисленными микроворсинками, которые в тысячу раз увеличивают резорбционную поверхность синцития. Строма третичной ворсины состоит из клеточных элементов (фибробласты и макрофаги), коллагеновых волокон и плодовых капилляров. Третичные ворсины развиваются только на той части поверхности хориона, которая прилегает к богато васкуляризированной базальной децидуальной оболочке. Эту часть хориона называют *ворсинчатым (ветвистым) хорионом*. Ворсинчатый хорион с покрывающим его амнионом образует плодную часть плаценты. На поверхности хориона, обращенной к капсулярной децидуальной оболочке, ворсины атрофируются и образуется *гладкий хорион*.

Некоторые крупные третичные ворсины тесно прикрепляются к базальной децидуальной оболочке — их называют *якорными, или ствольными, ворсинами*. Остальные, более мелкие ворсины отходят от ствольных, ветвятся, свободно лежат в межворсинчатом пространстве и омываются материнской кровью.

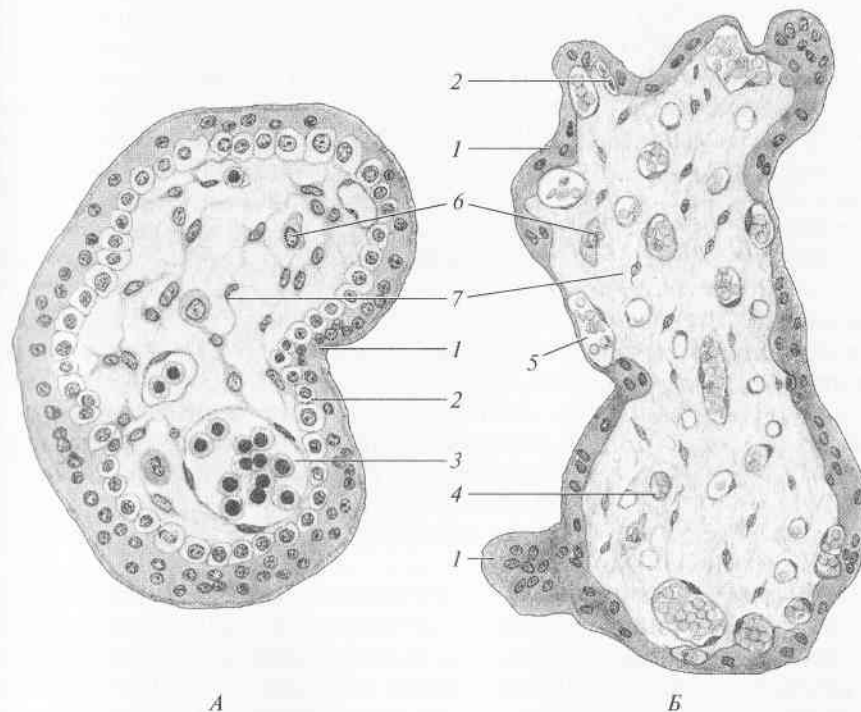


Рис. 78. Строение третичных ворсин хориона человека:

А — эмбрион в возрасте 6,5 недель; Б — доношенный эмбрион; 1 — синцитиотрофобласт; 2 — цитотрофобласт; 3 — кровеносный сосуд; 4 — капилляр; 5 — капилляр, прилегающий к слою синцитиотрофобласта; 6 — клетки Хофбауэра; 7 — мезенхимные клетки

Васкуляризация (формирование кровеносных сосудов) в ворсинах хориона начинается после того, как в них врастает мезодерма аллантаоиса (3-я неделя беременности). С момента образования третичных ворсин начинается переход от гистотрофного питания зародыша (за счет эмбриотрофа) к гемотрофному (за счет питательных веществ, поступающих в ворсины хориона из кровотока матери). Васкуляризация третичных ворсин и окончательное формирование плаценты завершаются к 16—18-й неделе беременности.

Понемногу слой цитотрофобласта теряет целостность и на 14—15-й неделе развития от него сохраняются только отдельные группы клеток (рис. 78, Б).

В предродовой период цитотрофобласт в концевых ворсинах практически исчезает, его отдельные клетки можно обнаружить только в области прикрепления ворсин хориона к материнским тканям.

Строение плаценты. У человека сформировавшаяся плацента (от лат. *placenta* — пирог, лепешка) напоминает лепешку или тонкий диск диаметром около 15 см. Плацента человека является децидуальной (отпадающей). Располагается плацента обычно на задней или передней стенке матки, иногда частично заходит на ее боковые стенки или дно. При нормально протекающей доношенной беременности и массе плода 3300—3400 г диаметр плаценты составляет 17—20 см, ее толщина 2—2,5 см, масса 500 г.

Различают две поверхности плаценты: *плодную*, обращенную к плоду, и *материнскую*, прилежащую к стенке матки. Плодная поверхность плаценты покрыта амнионом — гладкой блестящей оболочкой сероватого цвета; к центральной ее части прикрепляется *пуповина*.

Материнская поверхность плаценты темно-коричневого цвета, разделена на 15—20 долек — котиледонов, которые отделены друг от друга перегородками (цв. вкл. VII). Каждый котиледон имеет автономное кровоснабжение из сосудов плода и содержит несколько стволых ворсин и их многочисленные ветви — концевые ворсины.

Газообмен. Из пупочных артерий деоксигенированная кровь плода поступает в сосуды ворсины, углекислый газ из крови плода переходит в материнскую кровь, попадающую в межворсинчатое пространство из спиралевидных артерий спонгиозной зоны децидуальной оболочки, а кислород из материнской крови переходит в капилляры хориона.

Оксигенированная кровь плода из котиледонов собирается к центру плаценты и затем попадает в пупочную вену. Деоксигенированная материнская кровь поступает из межворсинчатого пространства в вены эндометрия. Материнская кровь и кровь плода не

смешиваются, между ними существует плацентарный барьер, состоящий из эндотелия капилляров, стромы и эпителия третичных ворсин хориона.

Защитная функция плаценты. Ворсины хориона осуществляют барьерную функцию. В синцитиотрофобласте и клетках стромы ворсин с помощью ферментов разрушаются экзогенные и эндогенные (образующиеся в организме матери и в организме плода) вредные вещества. Продукты распада выбрасываются в межворсинчатое пространство. Барьерная функция плаценты зависит от ее проницаемости. Проницаемость *гемоплацентарного барьера* для различных веществ различна и во многом зависит от их химических свойств: молекулярной массы, растворимости в липидах, ионизации и т.д. Вещества с низкой молекулярной массой проникают через гемоплацентарный барьер легче, чем с высокой (наиболее низка проницаемость плаценты для веществ с молекулярной массой выше 1000); растворимые в липидах проникают легче, чем растворимые в воде. Для ионизированных веществ проницаемость значительно выше, чем для веществ, не несущих заряда.

Степень и скорость перехода веществ через плаценту также определяются различными факторами, в том числе площадью и толщиной синцитиокапиллярных мембран, лишенных микроворсин, интенсивностью маточно-плацентарного кровотока, уровня перфузионного давления. При различных патологиях беременности (поздние токсикозы беременных, некоторые эндокринные и инфекционные заболевания) проницаемость гемоплацентарного барьера увеличивается.

Препараты к занятию «Плаценты»

Препарат № 1. Эпителиохориальная плацента свиньи: гистологический срез

Задание. При малом увеличении рассмотрите и зарисуйте материнскую и плодную части плаценты (схему расположения складок эндометрия и входящие в них ворсинки хориона). При большом увеличении рассмотрите и зарисуйте строение плодной части плаценты (энтодерма аллантаоиса, висцеральная мезодерма аллантаоиса, содержащая кровеносные сосуды, париетальная мезодерма хориона, трофэктодерма хориона) и материнской части плаценты (покажите люминальный эпителий матки, капиллярные сплетения, располагающиеся под люминальным эпителием, маточные железы, пронизывающие эндометрий, крупные вены и артерии, располагающиеся в эндометрии).

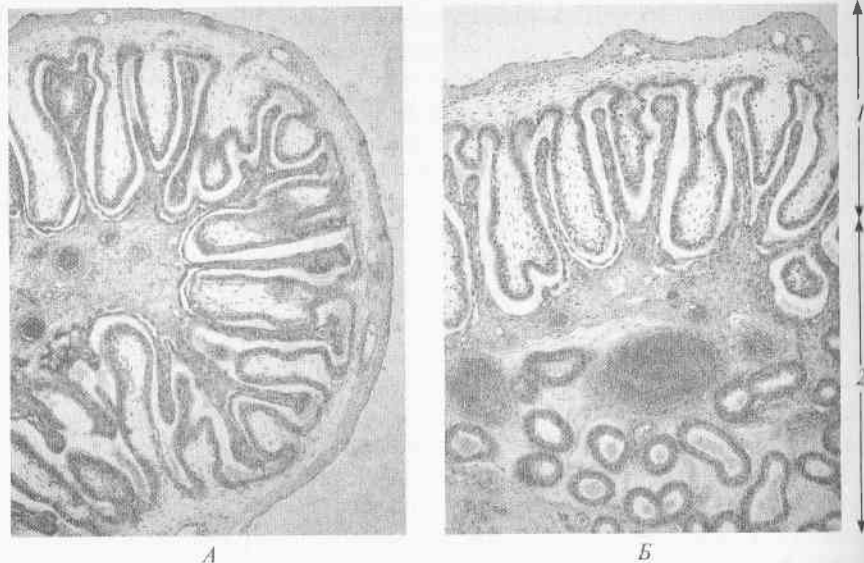


Рис. 79. Препарат плаценты свиньи:

А — общий вид; Б — вид при большом увеличении; 1 — плацента; 2 — стенка матки

На рис. 79, А показан препарат плаценты свиньи: слева — более темные маточные крипты, справа — более светлые, окаймленные слоем трофобласта ворсины хориона; пространство, окружающее структуры хориона — полость аллантоиса. При большом увеличении (рис. 79, Б, структуры хориона — сверху) хорошо видны маточные железы, выстланные кубическим эпителием, и заполнены секретом.

Маточные крипты выстланы слоем плоских эпителиальных клеток, под которым находится сеть тончайших капилляров. Часто их просвет всего лишь чуть больше, чем диаметр эритроцитов.

В области хориона можно различить следующие слои:

- 1) полость аллантоиса выстлана одним слоем сильно вытянутых клеток, которые хорошо видны на препарате, — это энтодерма аллантоиса;
- 2) расположенный на рисунке ниже темный слой, в котором видны кровеносные сосуды, — мезодерма аллантоиса; по своему происхождению это висцеральный листок латеральной мезодермы;
- 3) более светлый и рыхлый пласт мезенхимных клеток, входящий в состав как хориальной пластинки, так и ворсин хориона, — мезодерма хориона; по своему происхождению это париетальный листок латеральной мезодермы;

4) слой темных клеток, одевающий снаружи ворсины хориона, — трофобласт.

Препарат № 2. Ворсина хориона человека (тотальный препарат)

Задача. При малом увеличении рассмотрите и зарисуйте строение стволовой (более толстой) и конечных (более тонких) ворсин хориона.

На тотальном препарате (рис. 80) видны стволовая ворсина и отходящие от нее конечные ворсины хориона. Такие препараты изготавливаются, как правило, из тканей рожденной плаценты, в которой слой цитотрофобласта практически полностью редуцирован. Все хорошо различимые на препарате клеточные ядра относятся к синцитиотрофобласту. Более детальное строение ворсин хориона представлено на следующем препарате.

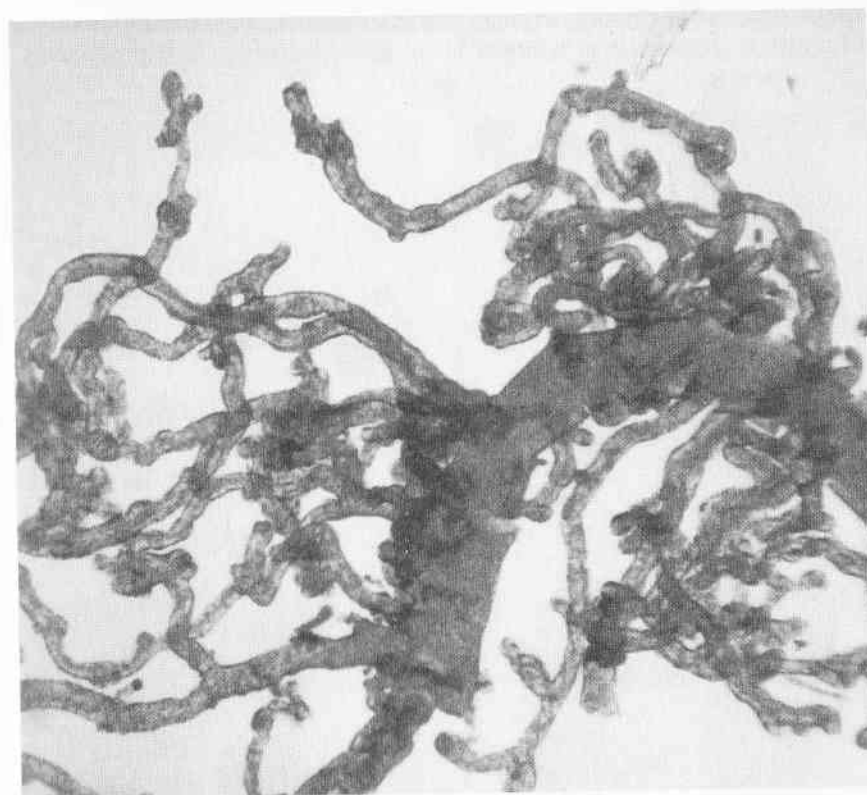


Рис. 80. Ворсина хориона человека

Препарат № 3. Гемохориальная плацента человека: гистологический срез

Задание. На малом увеличении зарисуйте общий вид строения участка плаценты человека, укажите на рисунке плодную и материнскую части, стволую, якорную и конечные ворсины. Выберите на препарате крупную ворсину, срезанную поперек, рассмотрите ее под большим увеличением и зарисуйте. Обратите внимание на строение трофобласта, покрывающего ворсину, на количество, морфологию и расположение сосудов внутри ее (рис. 81).

Большинство препаратов плаценты, предлагаемых на студенческих практикумах, изготавливаются из последа, отошедшего при родах. В такой полностью зрелой плаценте практически не сохраняются клетки цитотрофобласта. На препаратах зрелой плаценты хорошо видны капилляры, примыкающие непосредственно к слою синцитиотрофобласта.

При малом увеличении видны элементы строения материнской части плаценты (децидуальные клетки, сосуды материнской части плаценты, форменные элементы крови матери, омывающей вор-

сины хориона), плодной части (ворсины хориона, стволые, конечные и якорные), а также внеклеточные эозинофильные структуры (фибриноид).

При большом увеличении кроме кровеносных сосудов стволкой ворсины (вена и артерия ворсин) можно различить элементы капиллярной сети конечных ворсин, часто расположенные прямо под слоем синцитиотрофобласта.

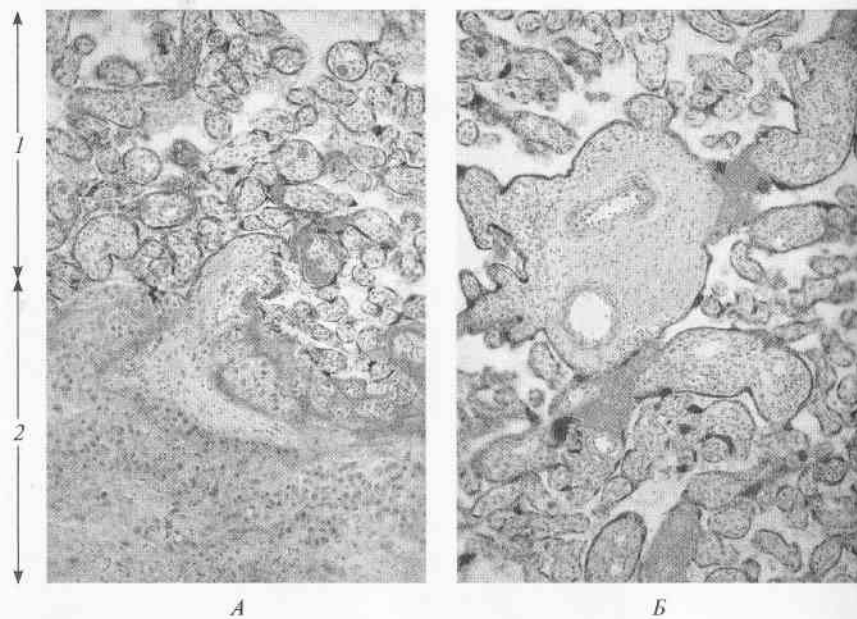


Рис. 81. Препарат плаценты человека:

А — строение материнской и плодной частей плаценты; *Б* — строение ворсины хориона; *1* — плодная часть плаценты; *2* — материнская часть плаценты

РЫБЫ. РАБОТА С ЖИВЫМ МАТЕРИАЛОМ (РАЗВИТИЕ ЭМБРИОНОВ ВЬЮНА)

Представитель костистых рыб — вьюн *Misgurnus fossilis* — принадлежит к семейству вьюновых Cobitidae, отряду карпообразных Cypriniformes, надотряду костистых рыб Teleostei. Эти небольшие (половозрелые особи имеют 25—30 см в длину) речные рыбки водятся почти на всей территории России.

Для эмбриологов вьюн давно стал лабораторным объектом в связи с возможностью датированного получения эмбрионального материала в период с октября по май.

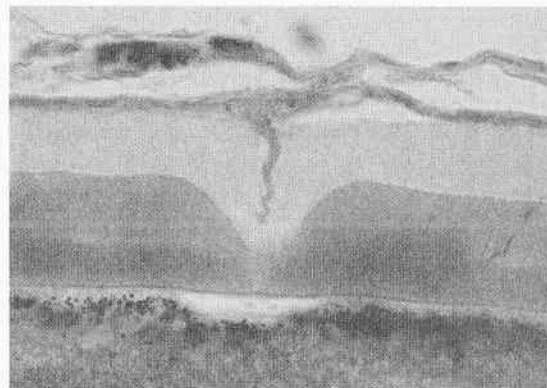
На икре вьюна проводится множество экспериментально-эмбриологических исследований с привлечением биохимических, молекулярно-биологических, биофизических, математических и прочих методов. Это, в частности, эксперименты по пересадке ядер, получению трансгенных животных, исследованию роли клеточных натяжений в эмбриогенезе, дистантных взаимодействиях между развивающимися зародышами и множество других.

Для вьюна составлены таблицы нормального развития (А. А. Костомарова, 1975), содержащие рисунки и описание определенных стадий развития зародышей от оплодотворения до стадии перехода на активное питание (около 10—15 суток развития в зависимости от температуры).

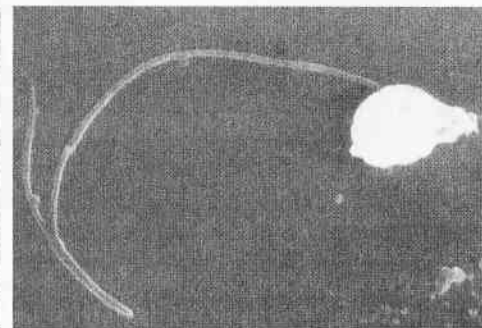
Отловленных в природе самцов и самок вьюна содержат в холодильнике. В семенниках самцов в сентябре—октябре уже содержится полностью зрелая сперма. Самкам вьюна для получения половых продуктов делают инъекцию гормонального препарата — хорионического гонадотропина, и через 36—48 ч они дают зрелую икру. Самца же усыпляют, выделяют семенники, измельчают их и готовят водную суспензию спермы. Процедура искусственного осеменения очень проста: икру поливают приготовленной суспензией, и в первые же секунды происходит процесс оплодотворения.

Яйца вьюна по количеству желтка относятся к *полилецитальным*, а по характеру его распределения в клетке — к *телолецитальным*. Икринки довольно крупные — более 1 мм в диаметре. На анимальном полюсе в оболочке находится *микропиле* (рис. 82, А, Б) в виде спирально закрученной воронки, диаметр внутреннего отверстия которой равен диаметру головки сперматозоида, что способствует предотвращению полиспермии. В момент овуляции

все зрелые яйцеклетки вьюна (как и у большинства позвоночных животных) находятся на стадии метафазы второго мейотического деления. Зрелые безакросомные спермии имеют в диаметре около 2 мкм (рис. 82, В). Оболочка икринок состоит из двух слоев: хорошо развитой *zona radiata* и плотно прилегающей к ней наружной ворсинчатой оболочки. Ворсинки мелкие и расположены таким образом, что при большом увеличении оболочка кажется ячеистой. При попадании яйца в воду ворсинки набухают, расправляются и становятся клейкими, что служит для прикрепления яиц к субстрату.



А



Б

В

Рис. 82. Проникновение сперматозоида сквозь оболочку ооцита у рыб: А — микропиле ооцита под световым микроскопом, гистологический срез; Б — микропиле в оболочке ооцита вьюна (*Misgurnus fossilis*); сканирующий электронный микроскоп, ув. 12000; В — сперматозоид вьюна; сканирующий электронный микроскоп, ув. 12000

К теме занятия «Оплодотворение».
Ознакомление студентов с процессами
искусственного осеменения и искусственной
активации икры костистых рыб
(на примере вьюна — *Misgurnus fossilis*)

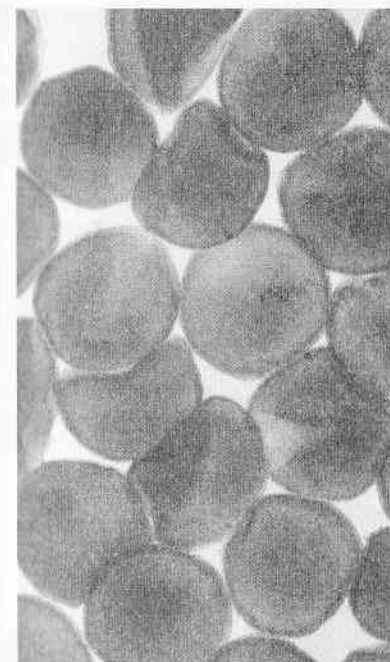
В задачу входит прижизненное наблюдение за реакцией активации яйцеклеток, отделением оболочки оплодотворения, образованием перивителлинового пространства, контактом воспринимающего бугорка и воронки микропиле, образованием второго полярного тельца. Каждый студент имеет возможность наблюдать перечисленные процессы индивидуально с помощью светового микроскопа.

На занятии каждый студент получает предметное стекло с лункой, в которую помещены несколько только что осемененных (или активированных) икринок. В ближайшие полчаса все изменения, которые можно увидеть в световой микроскоп, совершенно одинаковы у оплодотворенных и искусственно активированных яиц. Активация производится отстоянной водой (водопроводную воду в открытой посуде отстаивают двое суток при комнатной температуре). Наблюдение занимает 15—20 мин (при температуре 17—19 °С). За это время произойдет снятие блока мейоза, продолжатся и завершатся мейотические преобразования в активированной икре.

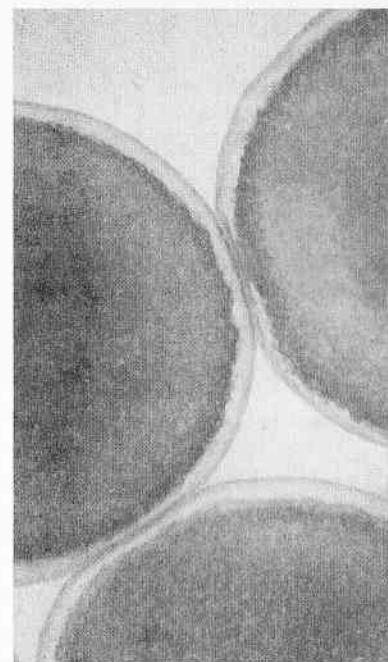
Во время наблюдения можно увидеть следующие процессы.

Сразу после момента активации от анимального полюса начинается кортикальная реакция яйцеклеток. Она распространяется в течение первых 2—3 мин по всей поверхности яйцеклетки. Икринки, похожие в момент помещения в воду на спущенные футбольные мячи, начинают приобретать округлую форму. В это время происходит экзоцитоз огромного количества кортикальных альвеол, расположенных в кортикальном слое яйца. Поверхность икринки вследствие этого бывает бугристой, со множеством «кратеров» различного диаметра (от 5—7 до 20—25 мкм), образующихся на оболочке во время экзоцитоза альвеол. Во время экзоцитоза кортикальных альвеол выделяется, в частности, гликопротеид, быстро насасывающий воду в пространство между цитоплазматической оболочкой икринки и оболочкой оплодотворения (рис. 83, А, Б).

Оболочка оплодотворения отделяется и образуется прозрачное, быстро увеличивающееся перивителлиновое пространство. Поверхность икринки постепенно сглаживается, поскольку поднимающиеся доньшки альвеол встраиваются в плазматическую мембрану (рис. 83, В).



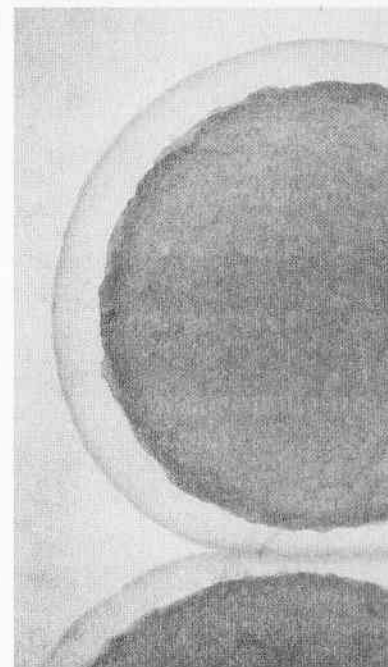
А



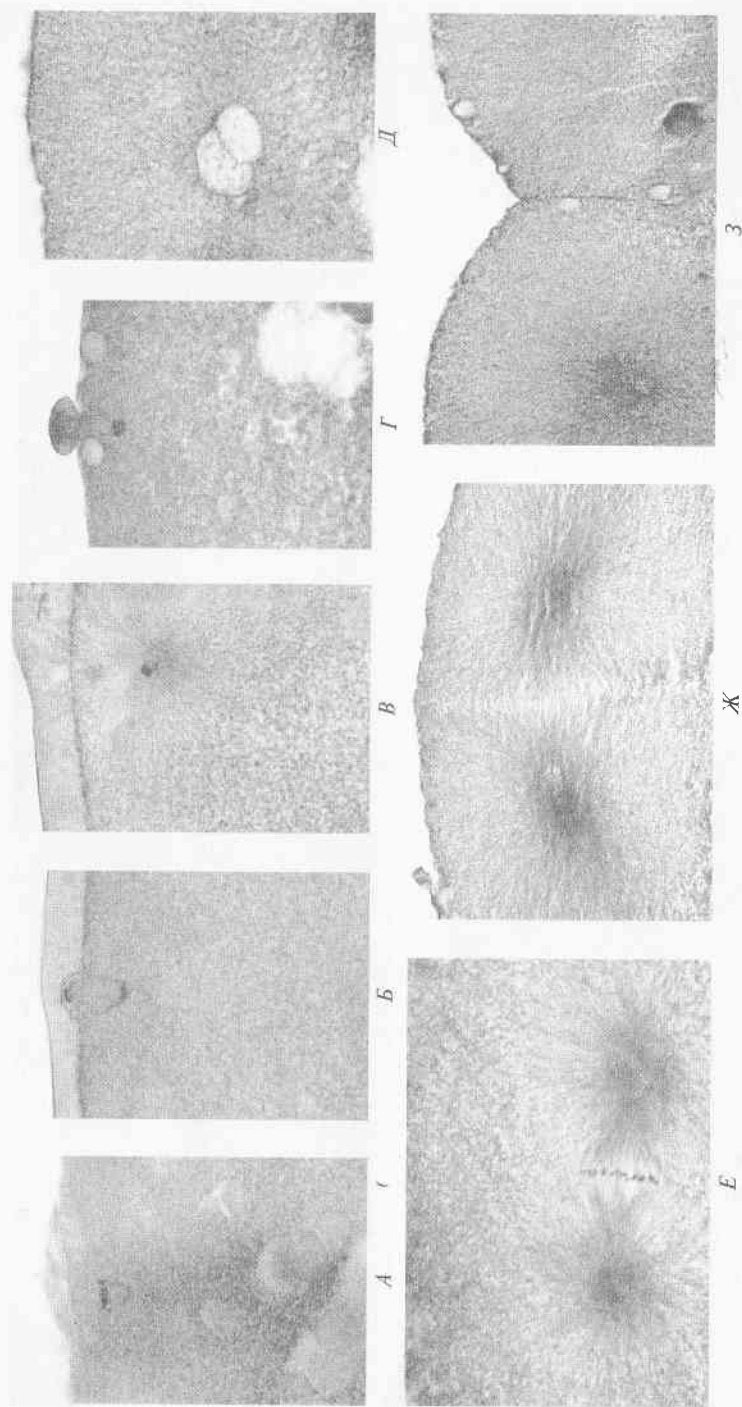
Б

Рис. 83. Реакция активации ооцита вьюна (*Misgurnus fossilis*), живые препараты:

А — икринки вьюна сразу после помещения в воду; Б — начало кортикальной реакции и экзоцитоза кортикальных альвеол (2—3 мин от момента активации); В — образование перивителлинового пространства и формирование оболочки оплодотворения (3—4 мин от момента активации)



В



Через 4—6 мин на анимальном полюсе можно видеть тесный контакт и постепенное расхождение *воронки микропиле* и *воспринимающего бугорка*, представляющего собой язычок прозрачной свободной от желтка цитоплазмы — это отображение процесса проникновения сперматозоида в яйцо. Необходимо отметить, что оплодотворенная (или активированная) икра хорошего качества, как правило, обращена анимальным полюсом вверх, поэтому для наблюдения необходимо найти в поле зрения икринку, анимально-вегетативная ось которой лежит параллельно доньшку стекла с лункой. В этом случае легко удастся найти в поле зрения область контакта воронки микропиле и бугорка и в течение 2—3 мин проследить динамику их постепенного расхождения. Перивителлиновое пространство продолжает быстро увеличиваться, но в оболочке оплодотворения в течение нескольких минут еще можно будет видеть все уменьшающуюся воронку микропиле (цв. вкл. VIII, А—В).

В течение последующих 7—10 мин на анимальном полюсе икринки образуется *цитоплазматический бугорок*. Уже видна довольно четкая граница между прозрачной цитоплазмой и плотным желтком (цв. вкл. VIII, В, Г).

Через 14—16 мин от момента активации начинается процесс образования *второго полярного (или редуccionного) тельца*, которое будет видно на анимальном полюсе на поверхности плазматической мембраны. Диаметр полярного тельца всего 10 мкм (в 100 раз меньше диаметра икринки), поэтому его можно обнаружить не сразу, так велик контраст между двумя сестринскими клетками — яйцеклеткой и полярным тельцем. Иногда рядом со вторым полярным тельцем можно видеть и первое, которое осталось «сидеть» на мембране яйцеклетки после первого мейотического деления (цв. вкл. VIII, Г).

На этом процесс наблюдения заканчивается. Активированные икринки в течение 2—3 ч от момента активации погибают. Икра вьюна не способна к партеногенетическому развитию: клеточный

Рис. 84. Гистологические срезы анимального полюса икринок вьюна (*Misgurnus fossilis*) в различные сроки после оплодотворения:

А — метафаза второго мейотического деления (3—5 мин после оплодотворения); Б, В — анафаза второго мейотического деления и головка сперматозоида (10—12 мин после оплодотворения); Г — телофаза второго мейотического деления, образование второго полярного тельца (15 мин после оплодотворения); Д — контакт мужского и женского пронуклеусов (30 мин после оплодотворения); Е — метафаза первого деления дробления (60—70 мин после оплодотворения); Ж — анафаза первого деления дробления (80 мин после оплодотворения); З — начало образования борозды первого деления дробления (100—110 мин после оплодотворения)

центр, необходимый для образования метафазного веретена дробления, вносится в яйцеклетку сперматозоидом, своего клеточно-го центра в яйцеклетке вьюна нет.

У оплодотворенных яйцеклеток примерно через 80—90 мин после образования второго полярного тельца (через 100—110 мин после осеменения) начнется дробление. Процессы, которые происходят внутри оплодотворенной яйцеклетки вьюна в период от момента оплодотворения до начала образования борозды первого деления дробления, представлены на рис. 84.

К теме занятия «Дробление».

Наблюдение за процессом дробления икры вьюна

Демонстрационный препарат с икринками помещается в поле зрения бинокулярного микроскопа. Студенты могут увидеть развивающихся зародышей на разных этапах дробления (2—4 бластомера, морула, ранняя, средняя и поздняя бластула) и сравнить живых зародышей вьюна на стадии двух бластомеров и средней бластулы с гистологическими срезами зародышей на этих стадиях.

Вьюн, как и все костистые рыбы, относится к животным с *меробластическим* типом дробления. На предыдущем занятии студенты могли наблюдать на осемененных или искусственно активированных яйцеклетках вьюна процесс формирования *цитоплазматического бугорка*, или *бластодиска*, — образования на анимальном полюсе зоны прозрачной, свободной от желтка цитоплазмы. Строение яйцеклеток таково, что в дробление вовлекается лишь эта зона, тогда как основная часть яйца, состоящая из так называемой желточной клетки, остается инертной. Таким образом, дробление у вьюна *неполное, дискоидальное*. Образование первой борозды дробления при комнатной температуре начинается через 100—110 мин после оплодотворения. Формируются 2, 4, 8, 16 бластомеров и т. д. (рис. 85, А—Г). Первые четыре борозды проходят меридионально, и до стадии 16 бластомеров все клетки расположены над желтком в один слой. Следующая борозда проходит экваториально, и 32 бластомера располагаются в два слоя. К стадии морулы (рис. 85, Д) образуются уже несколько слоев клеток. Интервалы между первыми пятью делениями дробления равны 35—40 мин — это период синхронного дробления. Затем следуют асинхронные деления; клеточный цикл постепенно удлиняется. Образующийся многоклеточный зародыш называется *дискобластулой* (рис. 85, Е—З).

На стадии средней бластулы зародыш состоит уже из 4—5 тыс. клеток. Клеточная часть зародыша — *бластодерма* отделена от желтка синцитиальным слоем с полиплоидными ядрами — *перибластом*.

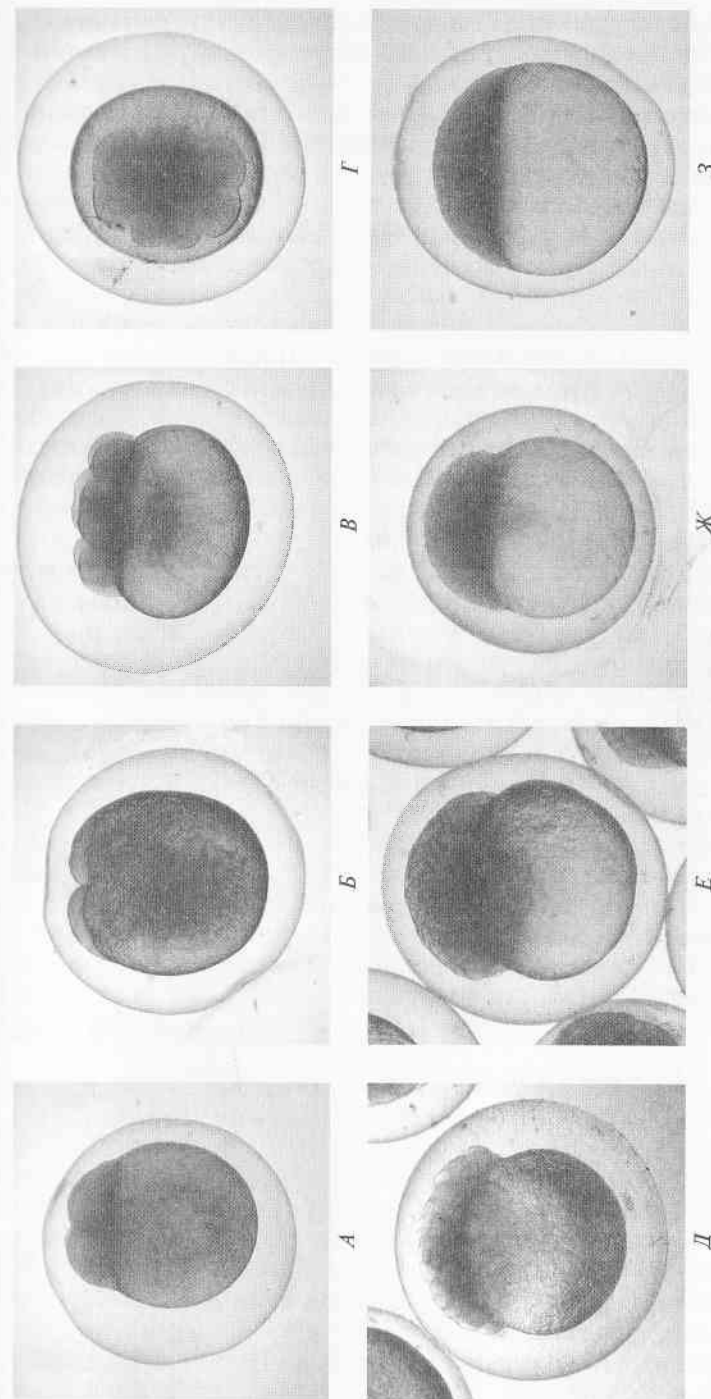


Рис. 85. Микрофотографии развивающихся эмбрионов вьюна (*Misgurnus fossilis*) на стадиях дробления (живые препараты): А — 2 бластомера; В — 4 бластомера; С — 8 бластомеров; Г — морула, вид с анимального полюса; Д — морула; Е — средняя бластула; Ж — поздняя высокая бластула; З — поздняя эпителиальная бластула

На занятии представляется хорошая возможность сравнить гистологические препараты зародышей вьюна на стадии 2 бластомеров, средней и поздней бластулы (см. рис. 30) с живыми зародышами тех же стадий (рис. 85). Многожелтковые яйца костистых рыб плохо поддаются гистологической обработке, так как желток после фиксации крошится при резке на микротоме, и качество срезов не очень хорошее. У живых зародышей видны прозрачные крупные бластомеры ранних стадий на желтом блестящем желтке; бластодерма бластулы имеет матовый оттенок. До стадии средней бластулы бластодерма выдается над желтком, придавая икринке вид головы в некоем головном уборе, за что и получила название «шапочка бластомеров». К поздней бластуле вся икринка постепенно вновь приобретает правильную округлую форму, а стадия, предшествующая гастрюляции, носит название *поздней эпителиальной бластулы* (в противоположность предшествующей *поздней высокой бластуле*) (рис. 85, Ж, З). Клетки поверхностного слоя — *перидермы* — уплотняются и сглаживают границу между бластодермой и желтком. Таким образом, к стадии поздней бластулы зародыш костистых рыб состоит из нескольких функциональных слоев — *перидермы*, *глубоких клеток бластодермы* и *перибласта*.

Перидерма состоит из одного ряда прочно связанных между собой клеток. Она не вовлекается в процессы развития зародыша и остается снаружи, формируя после вылупления часть эктодермы, исчезающую в процессе личиночного развития. Глубокие клетки находятся непосредственно под перидермой. Из этих нескольких слоев клеток впоследствии образуется зародыш.

Перибласт (желточный синцитий) — это рано дифференцирующаяся высокоспециализированная структура. Основные функции перибласта — это вителлолизис, позволяющий зародышу использовать пищевой запас, заключенный в желтке, синтез некоторых веществ. Кроме того, перибласт является адгезивным субстратом для движущихся глубоких клеток.

К теме занятия «Гастрюляция».

Процесс гастрюляции у зародышей вьюна

Студенты смотрят развивающихся зародышей вьюна на разных стадиях гастрюляции (ранняя, средняя и поздняя гастрюла). На зародышах этих стадий особенно ярко можно продемонстрировать процесс эпиболии (обрастания) желточного мешка:

1) зародыш вьюна на стадии ранней гастрюлы — начало обрастания поверхности желтка — стадия 13 (рис. 86, А);

2) зародыш вьюна на стадии средней гастрюлы — бластодерма обросла примерно половину желтка — стадия 14 (рис. 86, Б);

3) зародыш вьюна на стадии поздней гастрюлы — бластодерма обросла $\frac{2}{3}$ поверхности желтка — стадия 15 (рис. 86, В).

На этом занятии студенты смотрят гистологические препараты разных стадий гастрюлы амфибий, а развивающиеся зародыши рыб представлены здесь лишь в качестве живого демонстрационного препарата. Вопрос о том, как происходит гастрюляция у костистых рыб, долгое время оставался неясным. В частности, сформировалось мнение, что течение этого процесса у рыб иное, чем у других видов позвоночных. Однако в последних работах было показано, что у рыб во время гастрюляции отдельные клетки и группы клеток совершают движения, очень похожие на инвагинационные движения амфибий. Перед началом гастрюляции поверхность желточной клетки выгибается внутрь бластодермы; краевая область бластодермы утолщается, формируется *зародышевое кольцо*. Гастрюляция начинается с процесса образования

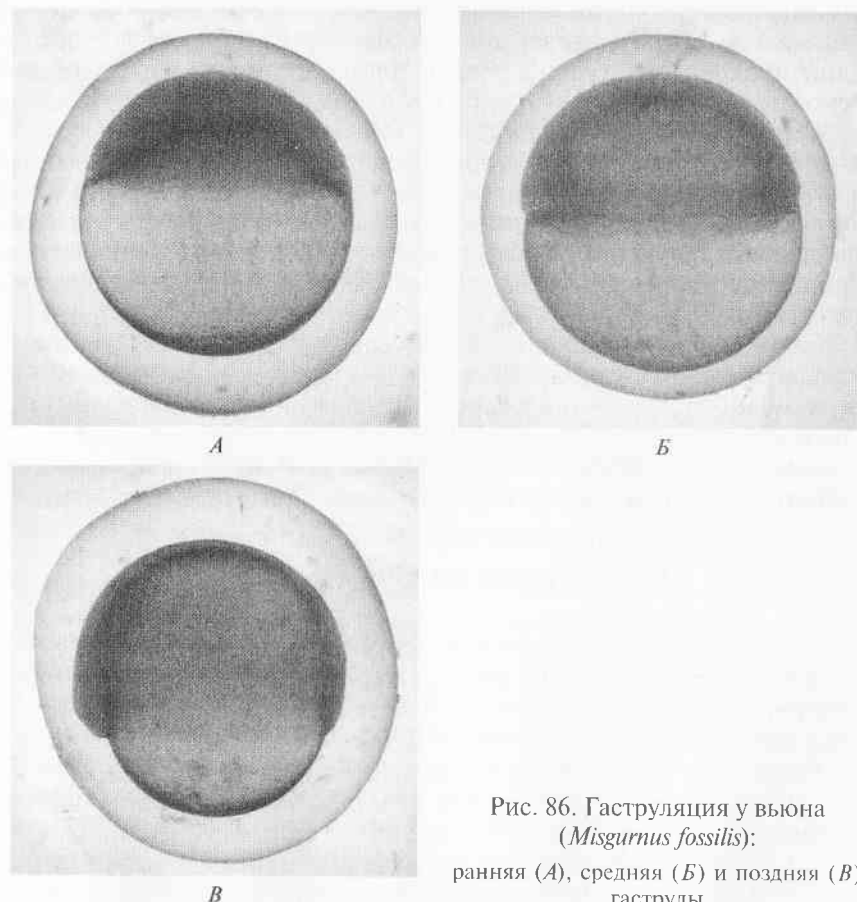


Рис. 86. Гастрюляция у вьюна (*Misgurnus fossilis*): ранняя (А), средняя (Б) и поздняя (В) гастрюлы

зародышевого щитка — скопления клеток на дорсальной стороне зародыша.

Не будем здесь подробно рассматривать не всегда согласующиеся друг с другом описания процесса гастрюляции у разных видов костистых рыб и остановимся на кратком изложении характера основных клеточных перемещений во время гастрюляции. Начиная с поздней бластулы клетки, расположенные под перидермой, подвергаются перегруппировкам, которые можно разделить на три характерных типа: радиальную интеркаляцию, ингрессию и латеро-медиальную интеркаляцию.

Радиальная интеркаляция в течение эпиболии смешивает клетки, лежащие в глубине и в более поверхностных слоях бластодермы. В результате бластодерма истончается и обрастает желточный мешок, т. е. происходит эпиболия.

Ингрессия (вселение) клеток, лежащих вблизи краевой зоны, приводит к формированию двух клеточных слоев — *эпибласта* и *гипобласта*. После ингрессии клетки движутся в направлении анимального полюса, но, увлекаемые эпиболией, поворачивают вновь в вегетативном направлении, двигаясь, таким образом, по зигзагообразной траектории. Вселившиеся внутрь клетки формируют два зародышевых листка — энтодерму и мезодерму.

Латеро-медиальная интеркаляция идет как в эпибласте, так и в гипобласте. Происходят движения схождения и одновременного вытяжения клеточных слоев на дорсальной стороне зародыша, в результате чего клетки выстраиваются вдоль передне-задней оси эмбриона.

Такие же движения клеток наблюдаются в ходе эмбриональных перестроек и у амфибий.

К теме занятия «Нейруляция».

Зародыши вьюна в период раннего органогенеза. Предличинки после вылупления из оболочка оплодотворения

На зародышах этих стадий особенно ярко можно продемонстрировать процесс сомитогенеза (дифференцировка мезодермы), формирование зачатка глаза (дифференцировка эктодермы) и процесс формирования хвостового отдела тела зародыша.

На этом занятии в качестве демонстрационных препаратов могут быть представлены зародыши вьюна на различных этапах органогенеза. Студенты могут рассмотреть на живых зародышах головной, туловищный и хвостовой отделы. Особенно четко видны хорда, сомиты, отделы головного мозга, глазные пузыри. На более

поздних стадиях студенты наблюдают сокращение сердца и ток крови по сосудам.

К началу органогенеза тело зародыша вьюна располагается на желточном мешке в виде валика. По мере развития и дифференцировки на зародышах благодаря их прозрачности можно рассмотреть: в головном отделе — производные эктодермы, мозговые пузыри (передний, средний и задний); в области переднего мозгового утолщения — зачатки глаз, плотные, овальной формы. Когда в них появляются щелевидные полости, это уже глазные пузыри. В области заднего мозга можно рассмотреть слуховые зачатки в виде плакод. В этот период в туловищном отделе зародыша прекрасно видны дифференцирующиеся сомиты, производные мезодермы, располагающиеся на дорсальной стороне в виде парных валиков, разделенных узкими щелями. Число сомитов постепенно возрастает, благодаря продолжающемуся обособлению их из задней несегментированной части мезодермы.

Под мезодермальным слоем зародыша располагается тонкий слой энтодермы. Задняя часть энтодермального зачатка слегка расширяется, и в ней появляется характерный для костистых рыб провизорный орган — купферов пузырек, названный в честь описавшего его немецкого эмбриолога К. Купфера. Функция его до сих пор не ясна. Показано лишь, что он возникает в заднем отделе зачатка кишки и вместе с ним перемещается в каудальном направлении, постепенно уменьшаясь. В месте исчезновения купферова пузырька образуется анальное отверстие.

После вылупления, которое обычно происходит на 4-е сутки развития, на зародышах вьюна особенно наглядно видны сокращения сердца, расположенного с левой стороны зародыша, между головой и желточным мешком. Сердце имеет мезодермальное происхождение. Хорошо видны сокращения сердца и пульсирующий кровоток по туловищным кровеносным сосудам. Видны даже отдельные форменные элементы крови. Только что вылупившиеся зародыши не пигментированы, так что кровь пока бесцветная. На вторые сутки после вылупления кровь приобретает слабо-розовую окраску. Появляется пигмент в глазах: в поверхностном слое эктодермы туловища и в эктодерме хвостового плавника видны распластанные звездчатые пигментные клетки — меланофоры. Такие зародыши уже очень подвижны, хотя начало мышечных сокращений происходит у них еще в оболочках примерно в начале 3 суток развития.

На рис. 87, А представлен зародыш вьюна на 29-й стадии развития (до 15 пар сомитов). На переднем конце тела зародыша хорошо видны зачатки глаз (дальний от наблюдателя глазной бокал просвечивает через прозрачные ткани головной части зародыша). Каудальнее глазных бокалов сквозь покровы тела видны мозговые пузыри. На дорсальной стороне зародыша хорошо различимы со-

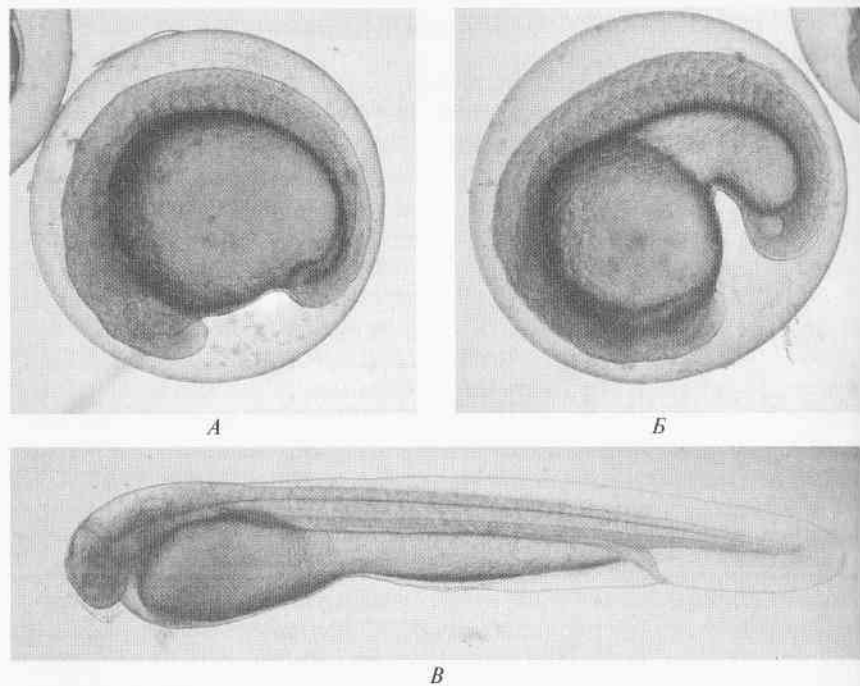


Рис. 87. Зародыши вьюна (*Misgurnus fossilis*) на стадиях органогенеза: А — 29-я стадия развития (15 пар сомитов); Б — 31-я стадия развития (19—20 пар сомитов); В — 38-я стадия развития (предличинка через сутки после вылупления)

миты. Немного краниальнее области сомитов можно заметить маленькое овальное образование — слуховую ямку.

На рис. 87, Б представлен зародыш вьюна на 31-й стадии (19—20 пар сомитов). На этой стадии хвостовой отдел начинает увеличиваться в длину и желток становится грушевидным. Слуховые ямки превратились в слуховые пузырьки. В хвостовой части тела хорошо заметно округлое прозрачное образование — купферов пузырек. На вентральной стороне передней части тела зародыша видна закладка сердца.

На рис. 87, В представлен зародыш вьюна через сутки после вылупления. На дорсальной стороне тела зародыша появляются темные точки — меланофоры. В переднем отделе тела различимы зачатки жабр, глазные и слуховые зачатки и сердце. На этой стадии развития можно наблюдать сердечные сокращения и движение крови по дорсальной аорте. Над желтком виден зачаток грудного плавника, а в задней части тела прорывается анальное отверстие.

Последовательные стадии развития вьюна (*Misgurnus fossilis*) при температуре 21,5 °С (по А. А. Костомаровой)

В эмбриологической литературе последовательные стадии развития животных принято обозначать порядковыми номерами.

В приведенной ниже таблице указано время наступления стадий развития при температуре 21,5 °С. Рекомендуемый интервал температур при инкубации зародышей вьюна от 14 до 22 °С. Показано, что время наступления стадий нормального развития в этом интервале достоверно не изменяется.

Стадии нормального развития зародышей вьюна

Номер стадии	Время	Внешние отличительные признаки стадии
<i>Зародышевое развитие</i>		
0	—	Зрелое яйцо в момент осеменения
3/4	45 мин	Оплодотворенное яйцо; отделение желточной оболочки от поверхности яйца; образование перивителлинового пространства, цитоплазматический бугорок на анимальном полюсе икринки (последний процесс еще полностью не завершен)
1 ^{1/2}	1 ч	2 бластомера, прохождение борозды первого деления меридионально
1	1 ч 30 мин	4 бластомера, прохождение борозды второго деления меридионально, перпендикулярно борозде первого деления
2	2 ч	8 бластомеров, прохождение двух борозд третьего деления меридионально, перпендикулярно борозде второго деления
2 ^{1/2}	2 ч 30 мин	16 бластомеров; прохождение двух борозд четвертого деления меридионально, перпендикулярно бороздам третьего деления
3	3 ч	32 бластомера; прохождение борозды пятого деления параллельно экватору икринки
3 ^{1/2}	3 ч 30 мин	Расположение 64 бластомеров в 2—3 слоя и образование высокой «шапочки»
4	4 ч	128 бластомеров
5	5 ч	Морула — расположение бластомеров в несколько слоев, образование бугристой шапочки; десинхронизация делений ядер

Номер стадии	Время	Внешние отличительные признаки стадии
6	6 ч	Ранняя бластула; «шапочка» бластомеров возвышена над желтком или несколько расплющена; наружные бластомеры образуют эпибласт; начало асинхронных делений ядер, падение митотического индекса; начало интенсивного синтеза РНК и морфогенетической функции ядер
7	7 ч	Средняя бластула; бластомеры мельче, чем на 6-й стадии, поверхность бластулы ровная
8	8 ч	Поздняя высокая бластула; шапочка мелких бластомеров еще несколько приподнята над желтком; отдельные бластомеры при малом увеличении неразличимы; между базальным краем бластодиска и желтком есть маленькая выемка
9	9 ч	Поздняя эпителиальная бластула; бластодиск плоский, слегка наползает на желток, его нижний контур неясный; выемка между бластодиском и желтком исчезла
10	10 ч	Начало гастрюляции; нижний контур бластодермы четкий; ее диаметр увеличился
11	11 ч	Утолщение периферических частей бластодермы и образование зародышевого кольца
12	12 ч	Образование зародышевого щитка
13	13 ч	Бластодерма обросла $\frac{1}{3}$ поверхности желтка; зародышевый щиток имеет форму язычка
14	14 ч	Бластодерма обросла $\frac{1}{2}$ поверхности желтка; зародышевый щиток имеет форму язычка, слегка расширенного в передней части; обособление хорды от мезодермы
15	15 ч	Бластодерма обросла $\frac{2}{3}$ поверхности желтка; образование закладки центральной нервной системы
16	16 ч	Бластодерма обросла $\frac{3}{4}$ поверхности желтка; «желточная пробка» большая, зародыш имеет вид сильно вытянутой пластинки, расширенной в головном конце
17	17 ч	Бластодерма обросла $\frac{4}{5}$ поверхности желтка
18	18 ч	Бластодерма обросла $\frac{7}{8}$ поверхности желтка

Номер стадии	Время	Внешние отличительные признаки стадии
19	19 ч	Окончание процесса обрастания, «желточная пробка» очень маленькая; зародыш вытянут в длину, передний конец его расширен, а задний несколько приподнят над «желточной пробкой»
20	20 ч	Конец обрастания; бластодерма полностью обросла желток; образование в головном конце зародыша мезодермальных валиков
21	21 ч	Появление 1-й пары туловищных сомитов
22	22 ч	Появление 3-й пары туловищных сомитов; начало распада мезодермальных валиков на отдельные клетки
23	23 ч	Появление 5-й и 6-й пар туловищных сомитов, образование плотных зачатков глаз
24	24 ч	Появление 7-й пары туловищных сомитов
25	25 ч	Появление 9-й пары туловищных сомитов
26	26 ч	Образование слуховых пузырьков; головной отдел увеличился и приподнялся над желтком
27	27 ч	Появление 11-й и 12-й пар туловищных сомитов; возникновение в ранее плотных зачатках глаз щелевидной полости; начало формирования хрусталика
28	28 ч	Появление 13-й пары туловищных сомитов
29	29 ч	Появление 15-й пары туловищных сомитов (начиная примерно с 15—17-й пары сомитов их размеры несколько уменьшаются и скорость образования увеличивается)
30	30 ч	Появление 17-й пары туловищных сомитов
31	31 ч	Появление 19—20-й пар туловищных сомитов; зародыш сильнее приподнят над желтком, головной конец увеличен и хорошо виден купферов пузырек; образование головной кишки и зачатка перикардальной полости; дифференцирование сомитов на миотом, склеротом и дерматом
32	32 ч	В туловищной мезодерме до 24 пар сомитов
33	33 ч	Появление 25—26-й пар туловищных сомитов; начало движения зародыша; увеличение зародыша в длину, хвостовой отдел начинает обособляться от туловищного отдела; желток становится груше-

Номер стадии	Время	Внешние отличительные признаки стадии
		видным; купферов пузырек маленький, не примыкает к желтку; начало инвагинации передней стенки глазного бокала, образование хрусталиковых плакод
34	37 ч	В туловищной мезодерме до 32 пар сомитов; хвост обособлен от желтка; хвостовая мезодерма не сегментирована; купферов пузырек расположен на уровне 32-го сомита; в каждом слуховом пузырьке два отолита; завершение формирования глазных бокалов
35	40 ч	В туловищной мезодерме 34 пары сомитов, в хвостовой мезодерме насчитывается 4—5 пар сомитов; появление желез выщипления, начало пульсаций сердца; желток имеет вид реторты; кровь бесцветная
36	46 ч	Стадия перед выщиплением; образование органа приклеивания, резкое уменьшение количества желез выщипления; в хвостовой мезодерме свыше 10 пар сомитов, желток имеет вытянутую форму с расширенной передней частью; оболочки ослаблены; зародыши энергично двигаются внутри оболочек; начало пигментации глаз; тело не пигментировано
37	50—52 ч	Стадия выщипления; голова приподнята над желтком, сердце слабо пульсирует, бесцветная кровь течет слабо; в хвостовой мезодерме 17 пар сомитов; есть зачатки оперкулярной и жаберной щелей; зачаток грудного плавника большой; прикрепление выщипавшихся предличинок с помощью органа приклеивания к водной растительности
<i>Предличиночное развитие</i>		
38	1-е сут после выщипления	Длина тела 5,5 мм; стадия установления эритроцитарного кровообращения; окончание сегментации хвостового отдела мезодермы; в хвосте 21—22 пар сомитов; закладка наружных жабер и появление пигмента; к свету безразличны
39	2 сут	Длина тела 5,8 мм; стадия появления зачатков усиков; меланофоры многочисленные; в глазах ясно виден пигмент; на свет не реагируют
40	5—6 сут	Длина тела 6,9 мм; стадия максимальной длины наружных жабер; появление подкишечных вен, сосудов в грудном плавнике и сети сегментальных сосудов в непарной плавниковой складке; глаза

Номер стадии	Время	Внешние отличительные признаки стадии
		пигментированы, почти черного цвета; желток заметно резорбировался; на свет не реагируют
41	Около 10 сут	Длина тела 7,6 мм; стадия перехода на активное питание (пищу разыскивают при помощи усиков); появление сосудов в анальном отделе плавниковой складки; возникновение сгущений мезенхимы в месте развития скелета будущих спинного и анального плавников

ПТИЦЫ. РАБОТА С ЖИВЫМ МАТЕРИАЛОМ (РАЗВИТИЕ ЭМБРИОНА КУРИЦЫ)

Непосредственные наблюдения куриного зародыша можно проводить различными способами: открыв доступ к зародышу удалением части скорлупы или производя снятие зародышевого диска с поверхности желтка. Последний способ позволяет лучше изучить строение зародыша на стадии инкубации 2—4 суток, в том числе лучше рассмотреть сокращения сердца, движение крови по сосудам, поскольку эмбрион, снятый с поверхности желтка, можно хорошо отмыть от желтка и поместить в теплом физрастворе под микроскоп для детального изучения в падающем и проходящем свете.

Снятие зародышевого диска с поверхности желтка можно производить следующим образом.

1. Вынуть из инкубатора яйцо и положить его на горизонтальную поверхность на 1—2 мин. За это время халазы развернут желток, и зародыш окажется в верхнем положении (рис. 88, А).

2. Взять яйцо двумя руками и, не меняя его ориентации (не поворачивая), поднести к чашке Петри, разбить скорлупу с нижней стороны яйца об ее край. Нужная степень разрушения скорлупы определяется по интенсивности вытекания белка из яйца: белок должен вытекать медленно.

3. Держа яйцо двумя руками и не меняя его положения, поместить его над центром чашки Петри на минимально возможном расстоянии от ее дна и быстро раскрыть яйцо с нижней стороны, не раздавив при этом скорлупу. В выпавшем в чашку Петри желтке зародыш должен лежать наверху, в центре желтка (рис. 88, Б).

4. Вырезать кольцо из фильтровальной бумаги и поместить его на зародыш таким образом, чтобы в отверстии кольца был виден весь зародыш, а ширина бумажной части кольца составляла бы 3—4 мм. На зародышах в стадии инкубации 3—4 суток бумажная часть кольца должна полностью закрыть всю кровеносную систему желточного мешка, что предотвратит случайное разрушение сосудов и вытекание из них крови, иначе сокращения сердца быстро прекращаются (рис. 88, В).

5. Через 3—4 мин (за это время кольцо присохнет к желточной оболочке) следует сделать 2—3 разреза в желточной оболочке по бокам желтка. Желток вытечет, его давление на оболочку будет

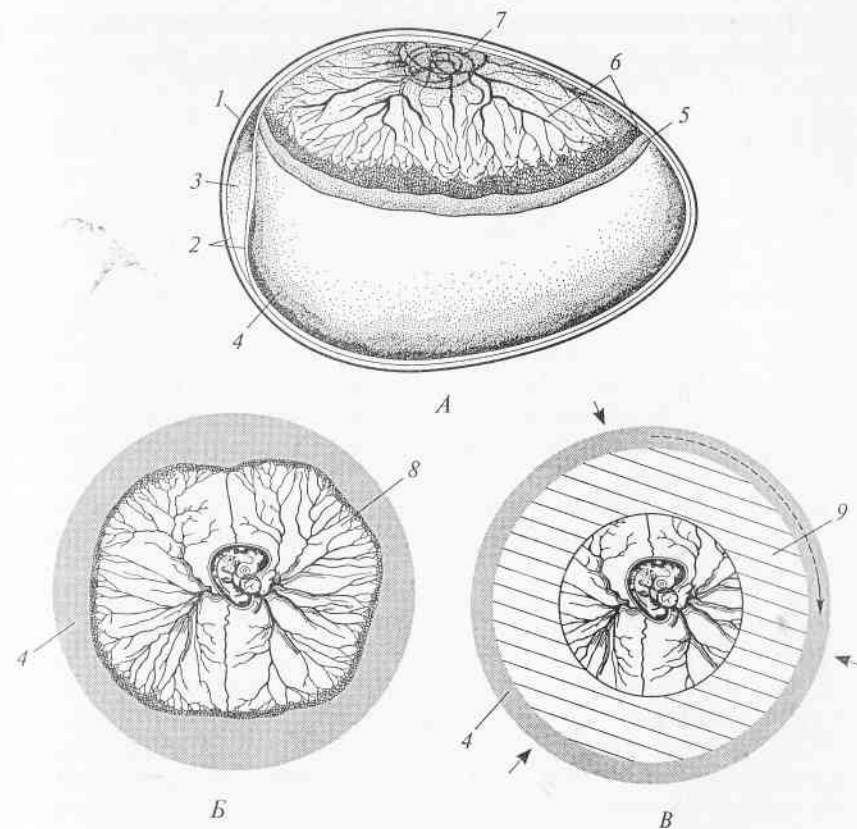


Рис. 88. Приготовление тотального препарата эмбриона курицы 4-го дня инкубации:

А — строение инкубированного яйца; Б — зародышевый диск на желтке; В — наложение бумажного кольца на зародышевый диск (стрелками указаны места, в которых надо надрезать оболочку желтка; пунктир — линия, по которой следует надрезать оболочку желтка по периметру бумажного кольца); 1 — скорлупа; 2 — подскорлуповые оболочки; 3 — воздушная камера; 4 — белок; 5 — желток; 6 — кровеносные сосуды зародышевого диска; 7 — тело зародыша; 8 — край обрастания; 9 — бумажное кольцо

снято и при дальнейших манипуляциях он не сможет попасть на кольцо и затопить зародыш.

6. По внешнему краю бумажного кольца сделать ножницами круговой разрез желточной оболочки, не оставляя при этом неразрезанных участков оболочки.

7. Взяв металлический шпатель, смочить его в белке или воде и подвести его под бумажное кольцо с зародышем, придерживая при этом пинцетом бумажное кольцо с противоположной от шпателя стороны. Глубина погружения шпателя под кольцо — 1—2 мм.

8. Подняв шпателем с желтка зародыш с кольцом, перенести его в чашку Петри или в более глубокую посуду, наполненную теплым (38—40 °С) физиологическим раствором. Опустить шпатель в раствор таким образом, чтобы бумажное кольцо с зародышем располагалось на поверхности раствора (кольцо не должно намочить), а шпатель с желтком должны быть погружены в раствор. Придерживая бумажное кольцо с желточной оболочкой пинцетом, начать производить шпателем короткие колебательные движения в горизонтальной плоскости

9. Через 30—60 с, по-прежнему придерживая кольцо с оболочкой пинцетом на поверхности раствора, осторожно отвести шпатель в сторону и вниз от кольца, но не вертикально вниз, а по диагонали в сторону, противоположную пинцету. При этом желток отделится от зародыша. После прекращения удерживания пинцетом кольца зародыш и кольцо должны остаться плавать на поверхности раствора.

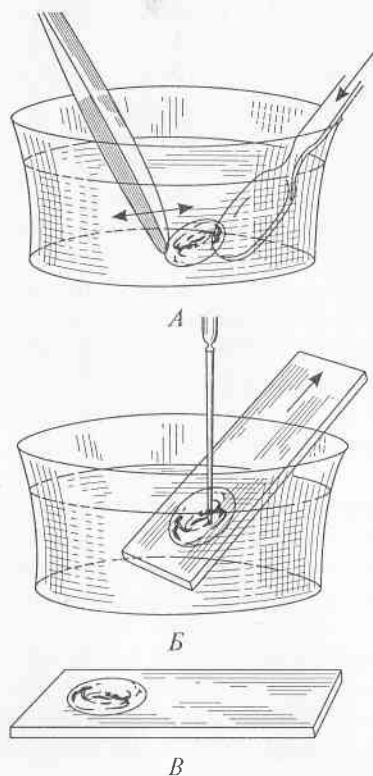
Если бумажное кольцо с эмбрионом намочило и начало тонуть, следует поддерживать его шпателем, не давая опуститься на дно и продолжать отмывку до полного отделения желтка (рис. 89, А).

10. Подвести под плавающее кольцо предметное стекло и вынуть его вместе с зародышем и кольцом (рис. 89, Б, В). Поместить стекло в чашку Петри и поставить под микроскоп. Рассматривая зародыш, следует облить его теплым физиологическим раствором из пипетки или налить этот раствор в чашку Петри.

В условиях практикума вместо физиологического раствора можно использовать теплую воду, что позволяет наблюдать сердечные сокращения в течение нескольких минут.

Рис. 89. Приготовление тотального препарата эмбриона курицы 4-го дня инкубации:

А — отмывка от желтка зародыша курицы в кристаллизаторе с теплой водой или физиологическим раствором; Б, В — перенос препарата на предметное стекло



Стадии нормального развития цыпленка (от начала и до 5 суток инкубации) (по М. Н. Рагозиной)

Эмбрион курицы — классический объект эмбриологии, именно на этом объекте выполнена большая часть исследований по развитию птиц. Домашняя курица (*Gallus Domesticus*) относится к семейству Gallidae. Породы кур несколько различаются по продолжительности эмбрионального развития. Так, длительность инкубации яиц кур яйценоских пород составляет 20 суток, а мясных пород — 21 сутки.

Овулировавшая яйцеклетка курицы одета только желточной оболочкой. После овуляции она быстро перезревает и, по некоторым данным, теряет способность оплодотворяться уже через 40 мин после овуляции. Сперматозоиды петуха способны сохраняться в половых путях кур от 12 до 35 дней. В воронку яйцевода, где происходит оплодотворение, спермии попадают на третьи сутки после спаривания или искусственного осеменения. В яйцо всегда проникает много сперматозоидов. Это явление называется физиологической полиспермией, она не нарушает нормального развития. Первая борозда дробления образуется через 3 ч после овуляции, вторая — через 20 мин после первой. До стадии 8 бластомеров эмбрион двигается по яйцеводу (это занимает 3—6 ч), а последующие деления яйца вплоть до стадии 128 бластомеров происходят в «матке». В «матке» и клоаке яйцо находится от 16 до 24 ч.

Развитие цыпленка от начала инкубации до вылупления детально изучено, и для него составлены подробные таблицы нормального развития (М. Н. Рагозина, 1961). В данном пособии мы приводим только выдержки из этих таблиц, охватывающие период от начала инкубации до 5-го дня инкубации включительно, т. е. периоды гастрюляции, нейруляции и раннего органогенеза (всего 27 из 46 стадий нормального развития) для эмбрионов яйценосной породы кур — белого леггорна. Следует, однако, иметь в виду, что определенное время подогрева яйца не гарантирует получения точно заданной стадии развития зародыша. Это может зависеть от многих причин. К наиболее существенным из них относятся следующие: генетически закрепленный определенный темп развития зародышей у разных пород кур; различия в стадиях развития зародышей в момент их попадания в инкубатор; различия в сроках и температуре хранения яиц до инкубации. Сюда же относятся такие факторы, как различия температуры внутри инкубатора, тип инкубатора и место в нем яйца. Определенное значение могут иметь также индивидуальные различия размеров и формы яйца, толщина лицевой скорлупы и др. Типично развитыми зародышами для каждого полного суток инкубации мы считали те, число которых на данной стадии развития и для данного времени было максимальным.

Стадия 1. После откладки яйца. Стадия до образования первичной полоски. «Эмбриональный щиток» можно видеть благодаря накоплению клеток в задней половине под бластодермой.

Стадия 2. Начальная стадия образования первичной полоски (обычно 6—7 ч инкубации). Первичная полоска впервые появляется в виде короткого конического утолщения у заднего края светлого поля (*area pellucida*). Его ширина у основания почти равна длине (0,3—0,5 мм).

Стадия 3. Промежуточная стадия образования первичной полоски (12—13 ч). Первичная полоска простирается от заднего края эмбрионального щитка до центра светлого поля. Она довольно широка на всем своем протяжении особенно на границе с темным полем (*area opaque*). Первичной бороздки нет.

Стадия 4. Стадия дефинитивной первичной полоски (18—19 ч). Первичная полоска достигает своей максимальной длины (средняя длина равна 1,88 мм). Имеются первичная бороздка, первичная ямка — гензеновский узелок. Светлое поле становится грушевидным, первичная полоска занимает от 2/3 до 3/4 его длины.

Стадия 5. Головной отросток (19—22 ч). Хорда, или головной отросток, в виде стрелки, образованного накоплением мезодермы, простирается вперед от гензеновского узелка. Головная складка еще не появилась. Так как длина головного отростка увеличивается, для большей точности определения стадии следует указывать его размер. Для данной стадии длина головного отростка равна 0,2 мм.

Стадия 6. Головная складка (23—25 ч). Впереди от хорды образовалась хорошо выраженная эктодермальная складка, которая обозначает теперь передний конец собственно зародыша. Туловищная мезодерма еще не сегментирована. Эта стадия существует короткое время, так как головная складка и первая пара сомитов быстро следуют друг за другом.

Наибольшее количество зародышей, полученных через 24 ч в условиях промышленной инкубации, соответствует 6—7-й стадиям, минус-варианты к этому времени находятся на 5-й стадии, а плюс-варианты могут достигать большей степени дифференцировки, вплоть до 9-й стадии включительно.

Выделение стадий с 7-й по 14-ю основано в первую очередь на числе пар сформированных и хорошо видимых сомитов. Этот показатель, по-видимому, является наиболее простым критерием для определения стадий на данном этапе развития, и он достаточно точен для практических целей. Границей между двумя соседними стадиями служит появление следующих трех пар сомитов; зародыши с промежуточным числом пар сомитов обозначаются прибавлением знака «плюс» или «минус» к соответствующей стадии. Так, «стадия 7» означает зародыша с одной парой сомитов, «стадия 7+» с двумя парами, «стадия 8-» с тремя парами и т. д.

Стадия 7. 1 пара сомитов (23—26 ч). В действительности это вторая пара сомитов ряда, так как первая еще ясно не обозначена. В области головы видны нервные валики.

Стадия 8. 4 пары сомитов (26—29 ч). Нервные валики соединены на уровне среднего мозга. В задней половине бластодиска имеются кровяные островки.

Стадия 9. 7 пар сомитов (29—33 ч). Появились глазные пузыри. Парные зачатки сердца начинают объединяться. Обнаруживаются первые аритмичные сокращения сердечной мышцы.

Стадия 10. 10 пар сомитов (33—38 ч). Первая пара сомитов начинает рассеиваться. Она не включается в подсчет числа сомитов на последующих стадиях. Первые признаки головного изгиба. Три первичных мозговых пузыря ясно различимы. Глазные пузыри не ссуты на основании. Сердце слабо изогнуто вправо.

Стадия 11. 13 пар сомитов (40—45 ч). Слабый головной изгиб. Различимы пять нейромеров заднего мозга. Передний невропор закрывается. Глазные пузыри сужены у основания. Сердце изогнуто вправо.

Стадия 12. 16 пар сомитов (45—49 ч). Голова поворачивается на левую сторону. Передний невропор закрыт. Обозначился передний мозг. Первичные глазные пузыри и глазной стебель хорошо выражены. Слуховая ямка глубокая, но широко открыта. Сердце слабо 8-образно изогнуто. Головная складка амниона покрывает всю область переднего мозга.

Стадия 13. 19 пар сомитов (48—52 ч). Голова частично или полностью повернута на левую сторону. Головной и шейный изгибы образуют широкие дуги. Отчетливо увеличился передний мозг. Слабое сужение отверстия глубокой слуховой ямки. Никаких признаков гипофиза. Наметилось сужение атриовентрикулярного канала. Головная складка амниона покрывает передний мозг, средний мозг и переднюю часть заднего мозга.

Наибольшее количество зародышей в условиях промышленной инкубации через двое суток достигают 13-й стадии, минус-варианты находятся на 11—12-й, а плюс-варианты — на 15-й стадиях развития. Типично развитых зародышей в возрасте двух суток инкубации характеризует начальный этап образования кровеносных сосудов в мезодерме формирующегося желточного мешка. Поперечная ось его сосудистого поля равна 1,5 см.

Стадия 14. 22 пары сомитов (50—53 ч). Головной изгиб: оси переднего и заднего мозга образуют при пересечении почти прямой угол. Шейный изгиб представляет собой широкую дугу. Поворот тела доходит до 7—9-й пары сомитов. Позади этого уровня появляется слабый изгиб, который обозначается как изгиб тела. Висцеральные дуги I и II, а также первая и вторая щели различимы. Задняя дуга не сформирована. Первичные глазные пузыри начинают впячиваться; образуется плакода хрусталика. Отверстие слу-

ховой ямки суживается. Становится различимой передняя доля гипофиза — карман Ратке. Вентрикулярная петля сердца расположена на вентральное атриовентрикулярного канала. Амнион достигает уровня 7—10-й пары сомитов.

После 14-й стадии точное определение числа сомитов становится затруднительным. Это обусловлено отчасти рассеиванием мезодермы первых пар сомитов, а на более поздних стадиях — сгибанием хвостового конца зародыша. Общее количество пар сомитов, указанное для следующих стадий, часто варьирует, что не может служить диагностическим признаком, поэтому в качестве критерия для определения последующих стадий используется развитие видимых снаружи структур, таких, как зачатки конечностей, висцеральные дуги и другие органы.

Стадия 15 (около 50—55 ч). Боковые складки тела простираются до переднего края закладки крыла, т. е. до 15—17-й пары сомитов. Зачатки конечностей: перспективные поля конечностей плоские, еще не ограниченные; неразличимое внешне скопление мезодермы на уровне крыла. Сомиты: 24—27 пар. Амнион простирается до 7—14-й пары сомитов. Оси переднего и заднего мозга образуют острый угол. Вентральные контуры переднего и заднего мозга почти параллельны. Шейный изгиб образует широкую дугу. Туловище отчетливо видно. Поворот туловища доходит до 11—13-й пары сомитов. Висцеральные дуги: III висцеральная дуга и третья щель различимы. Последняя корочка второй щели, обычно имеет овальную форму. Глазной бокал полностью сформирован, двойной контур различим в области радужной оболочки.

Стадия 16 (около 51—56 ч). Боковые складки тела простираются до 17—20-й пары сомитов между уровнями закладок крыла и ноги. Конечности: закладка крыла представляет собой утолщенный край боковой туловищной складки, закладка ноги еще плоская, представлена уплотнением мезодермы. Сомиты: 26—28 пар. Амнион достигает 10—18-й пары сомитов. Все изгибы зародыша более выражены, чем на 15-й стадии. Поворот тела распространяется до 14—15-й пары сомитов. Хвостовая почка представляет собой короткий прямой конус, отграниченный от бластодиска.

Третья жаберная щель все еще овальной формы. Передний мозг удлинен. Перетяжки между отделами мозга стали глубже. Эпифиз неразличим или еще не сформирован.

Стадия 17 (около 52—64 ч). Боковые туловищные складки простираются вокруг всего тела. Почка крыла и почка ноги приподнимаются над бластодиском вследствие сгибания туловищной складки. Оба образования приблизительно одинакового размера. Сомиты 29—32 пар. Амнион значительно варьирует в развитии, начиная от состояния, при котором задняя часть тела (приблизительно от 26-й пары сомитов) и хвостовая почка зародыша остаются непокрытыми им до полного замыкания складок, за исклю-

чением небольшого отверстия над 28—36-й парами сомитов. Обычны промежуточные стадии, при которых передняя складка амниона доходит до 25-й пары сомитов, а задняя покрывает часть хвоста. Головной изгиб не изменился. Шейный изгиб выражен лучше, чем на предыдущей стадии, но его угол все еще больше 90°. Туловищный изгиб различим на уровне плеча. Поворот доходит до 17—18-й пары сомитов. Хвостовая почка изогнута вентрально. Ее мезодерма не сегментирована. Эпифиз различим в виде шишки. Признаки носовых ямок. Закладка аллантаоиса еще не появилась.

Стадия 18 (около 65—68 ч). Почки конечностей увеличились. Почка ноги немного больше почек крыла. Отношение длины к ширине (Д/Ш) почки ≤ 6 (Д — длина измерена вдоль стенки тела; Ш — ширина, расстояние от стенки тела до верхушки почки). Сомиты: 30—36 пар; простираются за уровень почки ноги. Амнион обычно замкнут, иногда имеется овальное отверстие над поясничной областью. В области шейного изгиба ось мозга образует с задней частью туловища почти прямой угол. Туловищный изгиб сместился к поясничной области. Поворот доходит до задней части тела, следовательно, почки ног располагаются теперь не в горизонтальной плоскости. Хвостовая почка повернута направо, приблизительно под прямым углом к оси задней части тела. Висцеральные дуги: верхнечелюстной отросток отсутствует или не заметен, четвертая жаберная щель неразличима или отсутствует. Аллантаоис имеет вид короткого толстостенного кармана.

Стадия 19 (около 68—72 ч). Почки конечностей увеличены, симметричны. Почка ног несколько больше и массивнее почек крыльев. Д/Ш почки крыла = 4—6. Сомиты: 37—40 пар, доходят до хвоста, но конец хвоста, направленный прямо, не сегментирован. В шейном изгибе ось мозга образует острый угол с осью туловища. Изгиб тела почти или полностью исчез вследствие поворота тела. Конец задней части туловища прямой до основания хвоста. Хвост изогнут, его конец направлен вперед. Висцеральные дуги: верхнечелюстной отросток образует заметный вырост, по длине он приблизительно равен нижнечелюстному отростку; первая жаберная щель в дорсальной части представлена узким отверстием, оно продолжается в неглубокую бороздку; дуга II выступает над поверхностью; четвертая щель в дорсальной части представляет собой довольно заметное впячивание, которое продолжается вентрально неглубокой бороздкой. Она не открывается в глотку как истинная (открытая) щель, но тем не менее гомологична остальным трем щелям. Аллантаоис в виде маленького карманообразного выроста варьирующего размера еще не пузыревиден. Глаз не пигментирован.

Наибольшее количество зародышей в возрасте трех суток инкубации достигают 18—19-й стадии, минус-варианты находятся на 17-й, а плюс-варианты на 20-й стадиях развития. Для типично

развитых зародышей мезодермальный слой желточного мешка (сосудистое поле) в поперечнике достигает 2,5 см. Зародыш покрыт желточной оболочкой яйца. Последняя значительно растянута вследствие сильного увеличения общей массы желтка, происходящего в результате прогрессивного нарастания в ней жидкой фракции слоя, перемещающегося из белковой оболочки яйца.

Стадия 20 (около 70—72 ч). Почки конечностей увеличились. Почки ног несколько больше почек крыльев. Почка крыла приблизительно симметрична; почки ног слегка асимметричны. Д/Ш крыла = 3—3,9; Д/Ш ноги = 3—2,3. Сомиты: 40—43 пары, конец хвоста еще не сегментирован. Шейный изгиб более выражен, чем на стадии 19. Изгиб в области хвоста начинает распространяться вперед в пояснично-крестцовую область. Контур середины туловища представляет собой прямую линию. Поворот завершен. Висцеральные дуги: верхнечелюстной отросток равен нижнечелюстному или превосходит его по длине; II дуга выступает над поверхностью; IV дуга менее выпукла и меньше III дуги; четвертая щель короче третьей; узкое отверстие в ее дорсальной части продолжается неглубокой бороздкой. Аллантаис пузыревидный, варьирующего размера; в среднем он равен величине среднего мозга. Глазной пигмент бледно-серого оттенка.

Стадия 21 (около 3,5 сут). Конечности увеличены, почки крыльев и ног слабо асимметричны, их проксимо-дистальные оси направлены каудально, и вершины почек лежат позади средней линии, разделяющей пополам ее основание. Задние контуры почек крыльев и ног круче передних, они образуют с линией основания углы, приблизительно равные 90°. Д/Ш крыла = 2,3—2,7; Д/Ш ноги = 2,0—2,5. Сомиты: 43—44 пары; конец хвоста несегментирован. Задний изгиб тела включает пояснично-крестцовую область. Дорсальный контур туловища прямой или слабо изогнут. Висцеральные дуги: верхнечелюстной отросток длиннее нижнечелюстного, доходит приблизительно до середины глаза; дуга II заметно выступает над поверхностью и перекрывает вентрально дугу III; дуга IV различима; четвертая щель все еще видна. Размер аллантаиса варьирует, обычно его длина больше, чем на 20-й стадии, может простираться до головы. Слабая пигментация глаз.

Стадия 22 (около 3,5 сут). Конечности: удлинненные почки направлены каудально; передние и задние контуры их почти параллельны основанию; Д/Ш крыла = 1,5—2,0; Д/Ш ноги = 1,3—1,8. Сомиты доходят до конца хвоста. Изгибы мало изменены. Дорсальный контур туловища — прямая или изогнутая линия. Висцеральные дуги мало изменены по сравнению со стадией 21: верхнечелюстной отросток увеличен; четвертая жаберная щель имеет вид длинного разреза. Аллантаис дорастает до головы и может закрывать передний мозг. Пигментация глаз отчетливо выражена.

Стадия 23 (около 3,5—4 сут). Конечности длиннее, чем на стадии 22, особенно удлиннились проксимальные части, передние и задние контуры которых стали параллельны, т. е. форма изменена лишь немного. Ширина почек ног и почек крыльев приблизительно равна их длине. Висцеральные дуги: верхнечелюстной отросток еще более удлинен: первая жаберная щель представляет собой ломаную линию, ее дорсальная часть — различимая щель, впереди от которой заметен маленький выступ; каудальная часть дуги II приподнята над поверхностью; дуги III и IV еще сохранились; третья щель представлена заметной бороздкой, четвертая щель редуцирована до узкой овальной ямки, находящейся на ее дорсальном конце. Дорсальный контур изгиба зародыша от заднего мозга до хвоста представляет собой изогнутую линию.

Стадия 24 (около 4 сут). Конечности: длина почек крыльев и ног заметно больше их ширины; пальцевая пластинка в крыле пока не обозначена; закладка пальцев в почке ног уже заметна, но пальцы еще не образованы. Висцеральные дуги: первая жаберная щель представляет собой изогнутую линию; имеются слабые признаки двух выступов на нижнечелюстном отростке и трех выступов на дуге II; вентральная часть нижнечелюстного отростка удаляется; дуга II удлинена гораздо шире нижнечелюстного отростка; дуга III редуцирована и частично закрыта дугой II; дуга IV уплощена; обе дуги (II и IV) лежат ниже общей поверхности жаберного аппарата; третья жаберная щель представляет собой удлиненную борозду, четвертая редуцирована до маленькой ямки.

Наибольшее количество зародышей в возрасте 4 суток инкубации достигают 24-й стадии, минус-варианты находятся на 20-й, а плюс-варианты — на 25-й стадиях развития. Для типично развитых зародышей характерны следующие особенности в строении провизорных органов: амнион плотно облепает тело зародыша, количество амниотической жидкости незначительное; аллантаис — небольшой мешочек со стенками равномерной толщины, сверху он соприкасается с серозой и, срастаясь с ней, образует хорио-аллантаис, желточная оболочка сброшена, ее остаток и халазы находятся под дном формирующегося желточного мешка.

Стадия 25 (около 4,5 сут). Конечности: различимы локтевой и коленный суставы (при рассматривании их с дорсальной и вентральной сторон); в пальцевой пластинке крыла пальцы еще не ограничены; в пальцевой пластинке ноги намечается слабое углубление, которое обозначает границу места образования третьего пальца ноги. Висцеральные дуги: верхнечелюстной отросток удлинен, он встречается со стенкой носовой борозды (обратите внимание на выемку в месте их соединения); имеются три по выступа с каждой стороны первой жаберной щели. Выступы на дорсальной стороне выглядят как круглые бугры, а нижний вырост с вентральной стороны первой жаберной щели — как плоский гре-

бень. Дорсальная часть дуги III все еще видна; третья и четвертая жаберные щели редуцированы до маленьких ямок.

Стадия 26 (около 4,5—5 сут). Конечности значительно удлинены; контуры пальцевой пластинки округлы; слабые признаки бороздки между вторым и третьим пальцами крыла; первые три пальца ноги ясно разграничены. Висцеральные дуги: контур верхнечелюстного отростка представлен ломаной линией, нижнечелюстной вырост удлинён вентрально; два более дорсальных выступа выдаются над поверхностью; средний выступ подразделен маленькой бороздкой, на дорсальном конце виден маленький бугорок; на дуге II два более дорсальных выступа слабо приподняты над поверхностью, вентральный выступ (он выглядит как край воротника) расширен и накрывает висцеральные дуги III и IV; две ямки, представлявшие третью и четвертую висцеральные щели, больше не видны.

Стадия 27 (около 5 сут). Конечности: контур пальцевой пластинки крыла угловат в районе первого пальца; заметны борозды между первым, вторым и третьим пальцами крыла; борозды между пальцами ноги различимы на внутренней и наружной поверхности пальцевой пластинки; первый палец ноги выступает и на тиббиальной части ноги образует тупой угол; конец третьего пальца ноги еще не заострен. Висцеральные дуги: контур верхнечелюстного отростка представляет собой изогнутую ломаную линию, нижнечелюстного отросток расширился вентрально и вырос вперед; вентральный конец второй жаберной дуги («воротник») расширился и продолжает расти назад, он заметно приподнимается над поверхностью.

Наибольшее количество зародышей достигают к 5-м суткам инкубации 26-й стадии, минус-варианты находятся на 25-й, а плюс-варианты — на 27-й стадиях развития. Для типично развитых зародышей характерны следующие особенности в строении провизорных органов: амнион — тонкостенный пузырь, наполненный амниотической жидкостью, его стенка ритмично сокращается. Аллантоис полностью закрывает амниотический пузырь или слегка превосходит его по размеру. Желточный мешок значительно увеличен из-за большого количества в нем жидкой фракции желтка. Его сосудистое поле (при горизонтальном положении яйца) соприкасается с подскорлуповой оболочкой в области верхнего края воздушной камеры. Белковая оболочка уплотнена. Ее объем уменьшен в 2 раза по сравнению с исходным состоянием.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Айзеницадт Т. Б. Цитология оогенеза. — М.: Наука, 1984.
2. Белоусов Л. В. Введение в общую эмбриологию. — М.: Изд-во МГУ, 1980.
3. Белоусов Л. В. Основы общей эмбриологии. — М.: Изд-во МГУ, 1993.
4. Бодемер Ч. Современная эмбриология. — М.: Мир, 1971.
5. Гилберт С. Биология развития: В 3 т. — М.: Мир, 1993.
6. Голиченков В. А. Биология развития. — М.: Изд-во МГУ, 1991.
7. Голиченков В. А., Иванов Е. А., Никерясова Е. Н. Эмбриология. — М.: Издат. центр «Академия», 2004.
8. Гормональная регуляция размножения у млекопитающих / Под ред. К. Остина, Р. Шорта. — М.: Мир, 1987.
9. Дьюкар Э. Клеточные взаимодействия в развитии животных. — М.: Мир, 1978.
10. Дыбан А. П. Раннее развитие млекопитающих. — Л.: Наука, 1988.
11. Карлсон Б. М. Основы эмбриологии по Пэттену: В 2 т. — М.: Мир, 1983.
12. Кнорре А. Г. Эмбриональный гистогенез. — М.: Медицина, 1971.
13. Объекты биологии развития. — М.: Наука, 1975.
14. Петтен Б. Эмбриология человека. — М.: Медицина, 1959.
15. Пособие к большому практикуму по эмбриологии: В 2 ч. / Под ред. Л. В. Белоусова, Н. В. Дабагян, М. З. Чунаевой. — М.: Изд-во МГУ, 1990.
16. Рагозина М. Н. Развитие зародыша домашней курицы в его соотношении с желтком и оболочками яйца (с таблицами последовательных стадий развития). — М.: Изд-во АН СССР, 1961.
17. Ромер А., Парсон Т. Анатомия позвоночных: В 2 ч. — М.: Мир, 1992.
18. Световая микроскопия в биологии: Методы / Под ред. А. Лейс. — М.: Мир, 1992.
19. Современные проблемы сперматогенеза / Под ред. Т. А. Детлаф. — М.: Наука, 1982.
20. Токин Б. П. Общая эмбриология. — М.: Высшая школа, 1970.
21. Хэм А., Кормак Д. Гистология. — М.: Мир, 1983. — Т. 5.
22. Balinsky B. I. An Introduction to Embryology. — Philadelphia; London; Toronto: W. B. Saunders Company, 1975.
23. Balinsky B. I. An Introduction to Embryology. — Philadelphia; London; Toronto: W. B. Saunders Company, 1984.
24. Carlson B. M. Human embryology and developmental biology. — Mosby Inc., 1999.
25. Scott F., Gilbert F. Developmental biology. — Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, Inc. Publishers, 2000.

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	3	Неполное дискоидальное дробление	67
Основы эмбриологического рисунка	4	Неполное поверхностное дробление	70
Эмбриологические препараты	8	Препараты к занятию «Дробление»	73
Методы работы с микроскопом	9	Препарат № 1. Целобластула морского ежа (<i>Strongylocentrotus</i> sp.): срез через полость бластоцеля	74
Занятие 1. Сперматогенез	14	Препарат № 2. Амфибластула травяной лягушки (<i>Rana temporaria</i>): меридиональный срез	74
Первичные половые клетки	14	Препарат № 3. Дробление вьюна (<i>Misgurnus fossilis</i>): два бластомера, меридиональный срез	76
Особенности сперматогенеза	15	Препарат № 4: Дискобластула вьюна (<i>Misgurnus fossilis</i>): меридиональный срез	78
Препараты к занятию «Сперматогенез»	23	Препарат № 5. Перибластула тутового шелкопряда (<i>Bombyx mori</i>)	79
Препарат № 1. Мазок спермы морской свинки	23	Занятие 5. Гастрюляция у амфибий	81
Препарат № 2. Мазок спермы тритона	24	Движения клеток при гастрюляции	81
Препарат № 3. Семенник крысы (гистологический срез)	25	Карта презумптивных зачатков шпорцевой лягушки (<i>Xenopus laevis</i>)	84
Занятие 2. Оогенез	30	Препараты к занятию «Гастрюляция у амфибий»	86
Особенности оогенеза	31	Препарат № 1. Сагиттальный срез зародыша шпорцевой лягушки на стадии ранней гастрюлы	86
Типы оогенеза	34	Препарат № 2. Сагиттальный срез зародыша шпорцевой лягушки на стадии средней гастрюлы	88
Препараты к занятию «Оогенез»	35	Препарат № 3. Сагиттальный срез поздней гастрюлы зародыша шпорцевой лягушки	88
Препарат № 1. Яичник костистой рыбы (гистологический срез)	36	Препарат № 4. Поперечный срез зародыша шпорцевой лягушки на стадии поздней гастрюлы	90
Препарат № 2. Яичник кролика (гистологический срез)	38	Занятие 6. Нейруляция у амфибий	93
Занятие 3. Оплодотворение	43	Формирование нейральной пластинки	93
Начальные процессы при оплодотворении	43	Образование нервного желобка и нервной трубки	94
Первый и второй блоки мейоза	49	Преобразования мезодермы в ходе нейруляции	96
Процессы, протекающие после вхождения сперматозоида в яйцеклетку	50	Препараты к занятию «Нейруляция у амфибий»	97
Ооплазматическая сегрегация	51	Препарат № 1. Поперечный срез зародыша шпорцевой лягушки на стадии ранней нейрулы	97
Препараты к занятию «Оплодотворение»	52	Препарат № 2. Поперечный срез зародыша шпорцевой лягушки на стадии средней нейрулы	99
Препарат № 1. Матка аскариды (поперечный срез): выделение первого редуцированного тельца	52	Препарат № 3. Поперечный срез зародыша шпорцевой лягушки на стадии поздней нейрулы	100
Препарат № 2. Матка аскариды (поперечный срез): выделение второго редуцированного тельца и образование оболочки оплодотворения	53	Препарат № 4. Парасагиттальный срез зародыша шпорцевой лягушки на стадии поздней нейрулы	100
Препарат № 3. Матка аскариды (поперечный срез): стадия пронуклеусов и первого деления дробления	55	Занятие 7. Раннее развитие и гастрюляция у птиц	104
Занятие 4. Дробление	58	Строение куриного яйца	104
Особенности клеточных циклов при дроблении	59	Дробление	104
Пространственная организация дробления	60	Гастрюляция	107
Полное равномерное дробление	62	Препараты к занятию «Раннее развитие и гастрюляция птиц»	111
Полное неравномерное дробление	64	Препарат № 1. Стадия первичной полоски (эмбрион курицы на стадии до 15 ч инкубации): тотальный препарат	111

Препарат № 2. Стадия хордального выроста (эмбрион курицы на стадии 18—20 ч инкубации): тотальный препарат	112
Препарат № 3. Стадия хордального выроста (эмбрион курицы на стадии 18—20 ч инкубации): поперечный срез	112
Препарат № 4 Стадия хордального выроста (эмбрион курицы на стадии 18—20 ч инкубации): сагиттальный срез	113
Занятие 8. Нейруляция у птиц	114
Препараты к занятию «Нейруляция у птиц»	115
Препарат № 1. Нейрула курицы: тотальный препарат	117
Препарат № 2. Средняя нейрула курицы: поперечный срез в области головного отдела	118
Препарат № 3. Средняя нейрула курицы: поперечный срез на уровне передних кишечных ворот	118
Препарат № 4. Средняя нейрула курицы: поперечный срез в области туловищного отдела	120
Препарат № 5. Средняя нейрула курицы: сагиттальный срез	120
Занятие 9. Начало органогенеза у птиц	121
Препараты к занятию «Начало органогенеза птиц»	133
Препарат № 1. Эмбрион курицы на стадии трех мозговых пузырей (30—33 ч инкубации): тотальный препарат	133
Препарат № 2. Эмбрион курицы на стадии пяти мозговых пузырей (35—40 ч инкубации): тотальный препарат	134
Препарат № 3. Эмбрион курицы на стадии поворота (48—50 ч инкубации): тотальный препарат	136
Занятие 10. Формирование внезародышевых оболочек у птиц	139
Препараты к занятию «Формирование внезародышевых оболочек у птиц»	141
Препарат № 1. Эмбрион курицы на стадии поворота: поперечный срез зародыша на уровне сердца	141
Препарат № 2. Эмбрион курицы на стадии поворота: поперечный срез зародыша на уровне смыкания амниотических складок	142
Препарат № 3. Эмбрион курицы на стадии поворота: поперечный срез через туловищный отдел	142
Препарат № 4. Начальный этап формирования аллантаоиса: тотальный препарат четырехсуточного эмбриона курицы	143
Занятие 11. Раннее развитие млекопитающих	145
Препараты к занятию «Раннее развитие млекопитающих»	150
Препарат № 1. Зиготы в ампулярной части яйцевода: гистологический срез яйцевода мыши на сроке беременности 0,5 суток	150

Препарат № 2. Эмбрионы мыши на стадии дробления: гистологический срез яйцевода мыши на сроке беременности 1,5—2,5 суток	152
Препарат № 3: Бластоциста в полости матки: гистоло- гический срез матки мыши на сроке беременности 4 суток	152
Препарат № 4. Бластоциста мыши на стадии 3,5—4,5 суток развития: полутонкий срез	153
Препарат № 5. Бластоциста мыши на стадии 3,5 суток развития: суховоздушный препарат	153
Препарат № 6. Начало имплантации: бластоциста на стадии 5—5,5 суток развития в маточной крипте: гистологический срез матки мыши	155
Занятие 12. Плаценты	156
Плацента свиньи	160
Плацента человека	163
Препараты к занятию «Плаценты»	167
Препарат № 1. Эпителиохориальная плацента свиньи: гистологический срез	167
Препарат № 2. Ворсинка хориона человека: тотальный препарат	169
Препарат № 3. Гемохориальная плацента человека: гистологический срез	170
Рыбы. Работа с живым материалом (развитие эмбрионов вьюна)	172
К теме занятия «Оплодотворение». Ознакомление студентов с процессами искусственного осеменения и искусственной активации икры костистых рыб (на примере вьюна — <i>Misgurnus fossilis</i>)	174
К теме занятия «Дробление». Наблюдение за процессом дробления икры вьюна	179
К теме занятия «Гастрюляция». Процесс гастрюляции зародышей вьюна	180
К теме занятия «Нейруляция». Зародыши вьюна в период раннего органогенеза. Предличинка после вылупления из оболочки оплодотворения	182
Последовательные стадии развития вьюна (<i>Misgurnus fossilis</i>) при температуре 21,5 °С (по А. А. Костомаровой)	185
Птицы. Работа с живым материалом (развитие эмбриона курицы)	190
Стадии нормального развития цыпленка (от начала до 5 суток инкубации) (по М. Н. Рагозиной)	193
Список литературы	201