

УДК 59:591.169.2

ОСОБЕННОСТИ РЕПАРАТИВНОГО ВОССТАНОВЛЕНИЯ ПЛАВНИКОВ МНОГОПЕРОВЫХ РЫБ (*Polypteridae*, *Actinopterygii*)

© 2012 г. А. И. Никифорова, В. А. Голиченков

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
Биологический факультет, кафедра эмбриологии

119234, Москва, Ленинские горы, д. 1/12

E-mail: alyonanmsu@gmail.com

Поступила в редакцию 18.10.11 г.

Окончательный вариант получен 07.11.11 г.

Эпиморфная регенерация плавников изучена у различных лучеперых рыб (*Actinopterygii*), однако виды, представляющие филогенетически базальные линии таксона, пока остаются вне внимания исследователей. Информации о регенерационных возможностях данных групп существенна, как для понимания эволюционных истоков феномена эпиморфной регенерации, так и оценки универсальности регенерационных потенциалов лучеперых. В связи с данной проблемой нами впервые была исследована регенерация плавников двух представителей семейства архаичных многоперых рыб (*Polypteridae*), каламоихта (*Erpetoichthys calabaricus*) и сенегальского многопера (*Polypterus senegalus*). Наряду с возможностью восстановления костных лучей, широко распространенной среди лучеперых, многоперые рыбы демонстрируют способность к эффективному восстановлению эндоскелета и мускулатуры основания плавника. Это необычное свойство позволяет представить многоперых в качестве новых модельных объектов изучения механизмов регенерации конечностей позвоночных.

Ключевые слова: регенерация плавников, лучеперые рыбы, многоперые, эндоскелет, костные лучи.

Лучеперые рыбы, или *Actinopterygii* обладают способностью к репаративной регенерации парных и непарных плавников. Согласно текущим представлениям, регенерационные потенциалы представителей различных семейств таксона ограничены кожной лопастью – дистальным компартментом плавника несущим многочисленные костные лучи, в то время как проксимальные структуры плавника – мускулатура и эндоскелет, не могут быть эффективно восстановлены (Akimenko et al., 2003; Galis et al., 2003; Padhi et al., 2004; Iovine, 2007). Регенерация костных лучей плавников изучена у многих *Actinopterygii*, включая известный модельный объект биологии развития, *Danio rerio* (Akimenko et al., 2003; Poss et al., 2003; Tal et al., 2010). Показано, что восстановление утраченных фрагментов кожной лопасти проходит по типу эпиморфной регенерации, через этап формирования недифференцированного предшественника, или регенерационной бластемы (Akimenko et al., 2003; Poss et al., 2003). Костные лучи в ходе регенерации образуются *de novo*, составляя продолжение лучей интактного фрагмента (Akimenko et al., 2003). Зависимость эффективности регенерации плавника от наличия костных лучей в интактном фрагменте была продемонстрирована в ряде ран-

них исследований, начиная с экспериментов М. Бруссоне, который пришел к заключению, что восстановление плавника происходит, только в том случае, если при ампутации в плавнике сохраняются проксимальные концы костных лучей (по Казанцеву, 1935). Впоследствии данное положение было экспериментально подтверждено для различных костистых рыб (*Teleostei*) (Morgan, 1906; Morrill, 1906; Wunder, 1938; Goss, Stagg, 1957), и в итоге определило современные представления о регенерационных лимитах в данной группе, а также в таксоне *Actinopterygii* в целом. Однако ряд фактов не позволяют считать выдвинутое положение строго универсальным: во-первых, описаны случаи регенерации парных и хвостового плавников, ампутированных проксимальнее уровня костных лучей, у мальков и ювельных особей нескольких семейств *Teleostei* (Казанцев, 1935; Кудокочев, Силкина, 1967); во-вторых, известна уникальная способность взрослых стернопиговых рыб (*Sternopygidae*, *Gymnotiformes*) регенерировать каудальный конец тела, включая мускулатуру и утраченные элементы эндоскелета (Kirschbaum, Meunier, 1981). Однако приведенные примеры не могут считаться доказательством наличия у *Actinopterygii* эффективной программы восстановления прокси-

мальных отделов плавников, так как в данных случаях регенерация не ведет к правильному восстановлению утраченных структур, а напротив, сопровождается значительными нарушениями строения конечностей. При этом данные факты ясно свидетельствуют о существовании межгрупповых различий среди Teleostei (костистых рыб) по способностям к регенерации различных структур конечностей. Более значимые межгрупповые отличия могут быть выявлены при сопоставлении регенерационных возможностей Teleostei (костистых рыб) и современных видов многоперообразных (Polypteriformes), осетрообразных (Acipenseriformes), амиеобразных (Amiiformes) и панцирничкообразных (Lepisosteiformes) представляющих филогенетически базальные линии Actinopterygii, однако об особенностях регенерации в этих группах нам практически ничего не известно. В связи с вопросом о пределах восстановительных потенции конечностей Actinopterygii нами впервые была исследована регенерация плавников у двух представителей семейства архаичных многоперовых рыб (Polypteridae), калабарского каламоихта (*Erpetoichthys calabaricus*) и сенегальского многопера (*Polypterus senegalus*).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

В работе были использованы сенегальские многоперы (*Polypterus senegalus*) и каламоихты (*Erpetoichthys calabaricus*) ювенильного возраста, приобретенные в ООО «Север Аква». В ходе эксперимента рыб содержали в аквариумах общей вместимостью 50 литров, группами по 5–10 животных, в условиях постоянной аэрации и при следующих значениях показателей воды: $T = 25–28^{\circ}\text{C}$, $\text{dH} = 10^{\circ}$, $\text{pH} = 6.8–7$. Животных кормили 3 раза в неделю мотылем (личинки *Chironomus*). Период предварительной акклиматизации рыб данным условиям содержания составлял от 7 до 14 дней. Все операции были выполнены после анестезии рыб в водном растворе MS-222 в разведении 1 : 4000. Для анализа регенерации плавников разных типов были созданы отдельные группы, проведение двух вариантов ампутации на одном животном не допускалось. Грудные плавники ампутировали глазами ножницами на уровне проксимальных окончаний базальных элементов эндоскелета, брюшные – на уровне дистальной трети основания, включающем эндоскелетные элементы, у хвостового плавника отрезали часть свободной лопасти, на уровне середины центральных костных лучей. После завершения регенерации грудные плавники ампутировали повторно и анализировали их строение. Так как предварительные наблюдения показали, что возможности объектов исследования не ограничены однократным восстановлением конечностей, в группе из 15 сенегальских многоперов дополнительно исследовали

эффекты повторных регенерации грудных плавников, в этом случае у многоперов ампутировали оба плавника, что, однако не сказывалось на их жизнеспособности. Особенности скелета интактных плавников и регенератов оценивали, анализируя тотальные препараты, полученные с использованием стандартных методик дифференциального выявления хрящевой и костной ткани Альциановым голубым и Ализариновым красным (Roussiaux, 1985), на этапе промежуточного просветления мягких тканей плавника использовали раствор трипсина (5 мг трипсина (НПП «ПанЭко») на 0.3 мл насыщенного раствора $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ и 0.7 мл dH_2O). Всего в исследовании было задействовано 35 сенегальских многоперов и 5 каламоихтов.

При выполнении операции и содержания животных мы руководствовались положениями нормативных документов и инструктивных материалов, рекомендованных Комиссией по биоэтике МГУ имени М.В. Ломоносова.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Полный набор плавников лучеперых рыб представлен хвостовым, анальным, спинным и парными брюшными и грудными плавниками. У многоперовых рыб, за исключением каламоихта, который утратил брюшные плавники, присутствуют все пять типов плавников. Из них парные грудные плавники являются наиболее специализированными, и могут служить многоперам в качестве опорных конечностей (рис. 1а). Так как морфологическая специализация плавника может быть ассоциирована с изменением его регенерационных возможностей, для общей оценки восстановительных потенции плавников многоперовых рыб нами были выбраны разные плавники: в случае сенегальского многопера – парные грудные и брюшные, а также хвостовой плавник, в случае каламоихта – грудные и хвостовой. Предварительный анализ морфологии плавников показал (рис. 1), что прошедшие метаморфоз ювенили обладают сформированным эндо- и экзоскелетом (костными лучами). Эндоскелет грудных, плавников представлен тремя базальными элементами, несколькими удлинненными радиальными элементами (медиальные радиалии) и уже сформировавшимся рядом дистальной хрящевой, расположенных на границе с дистальной лопастью и таким образом полностью соответствует дефинитивному плану (рис. 1б, 1г). Также как и в грудных плавниках, скелетные структуры брюшных и хвостовых плавников были полностью дифференцированы (рис. 1в; 3г).

Наши наблюдения показали, что ювенили способны к регенерации всех тестированных типов плавников, кроме того плавники могут быть восстановлены повторно.

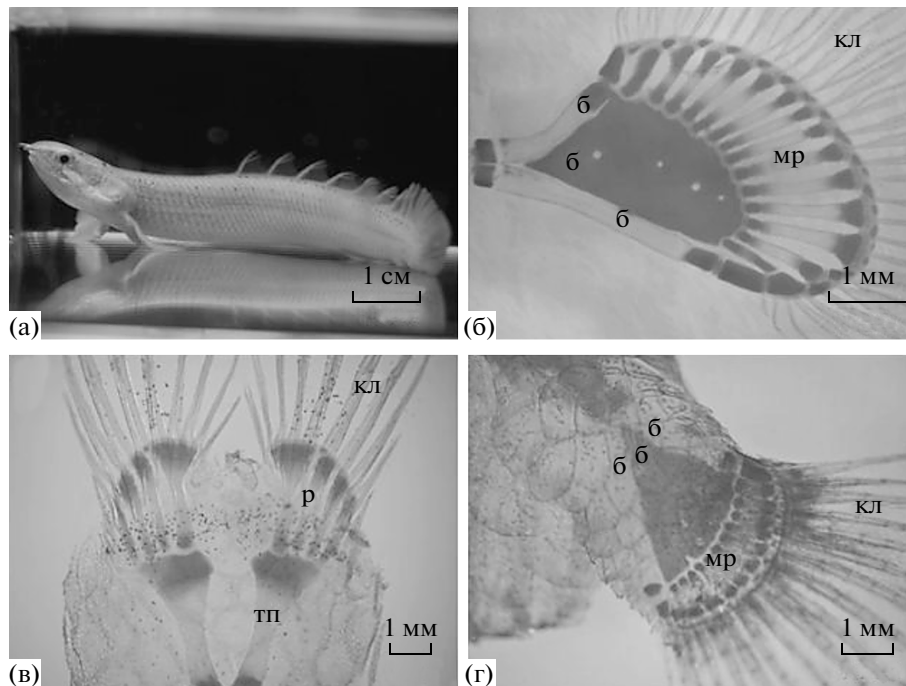


Рис. 1. Парные плавники многоперовых: а – Сенегальский многопер, *Polypterus senegalus*, представитель древнего семейства Polypteridae. Необычные грудные плавники с узким основанием и развитой мясистой лопастью при необходимости могут служить многоперу опорными конечностями; б – эндоскелет грудного плавника сенегальского многопера; в – брюшные плавники сенегальского многопера. Эндоскелет плавника представлен несколькими удлиненными элементами (р), прикрепленными к тазовому поясу (тп); г – грудной плавник калабарского каламоихта (*Erpetoichthys calabaricus*) внешне схожий с плавников многопера, отличается относительно меньшей длиной медиальных радиалий (мр). б – базальные элементы эндоскелета, кл – костные лучи.

Регенерация свободной лопасти хвостового плавника, рассеченного на уровне середины центральных костных лучей, полностью завершается спустя месяц после ампутации, однако основные структуры лопасти плавника – костные лучи и кровеносные сосуды восстанавливаются уже к концу третьей недели регенерации. Оба исследованных вида регенерируют каждый индивидуальный костный луч хвостового плавника (рис. 3г), это вместе с отсутствием иных явных морфологических нарушений говорит о высокой эффективности регенерации дистальных отделов плавников.

Регенерация грудных плавников, ампутированных на уровне проксимальных окончаний базальных элементов эндоскелета, у обоих видов протекает сходным образом (рис. 2): после этапа заживления раны, на месте утраченного плавника формируется конический регенерат (регенерационная бластема) (рис. 2б), впоследствии он увеличивается в размерах, а его дистальный край уплощается и формирует тонкую пластинку – зачаток будущей кожной лопасти (рис. 2г). Постепенно с ростом регенерата происходит *de novo* образование структур грудного плавника. К концу третьей недели регенерации между двумя отделами плавника появляется четкая граница, в дистальной лопасти

сформированы костные лучи (рис. 2д). Полное восстановление грудных плавников занимает в среднем 2.5 месяца.

Последовательность событий регенерации брюшных плавников многоперов в целом повторяет ход регенерации грудных: спустя несколько дней после регенерации на ампутиционной поверхности формируется предшественник утраченного фрагмента плавника, в котором впоследствии дифференцируются дистальная лопасть, и дистальная часть основания плавника.

Анализ морфологии регенератов парных плавников указывает на сохранение исходной структурной сложности и характерных анатомических особенностей эндо- и экзоскелета (рис. 3а–3в). Однако, как правило, в регенератах грудных и брюшных плавников восстанавливается меньшее в сравнении с нормой число отдельных скелетных элементов. Редукционные тенденции нарастают в ряду повторных регенераций (табл., рис. 4), в базальном отделе эндоскелета грудных плавников многоперов восстанавливается меньше трех элементов (рис. 3а; 4в, 4г), таким образом, регенераты утрачивают типичное трибазальное состояние, характерное для грудного плавника в норме. Как правило, в базальном отделе не дифференцируется один из краевых удлиненных элементов (рис. 3а),

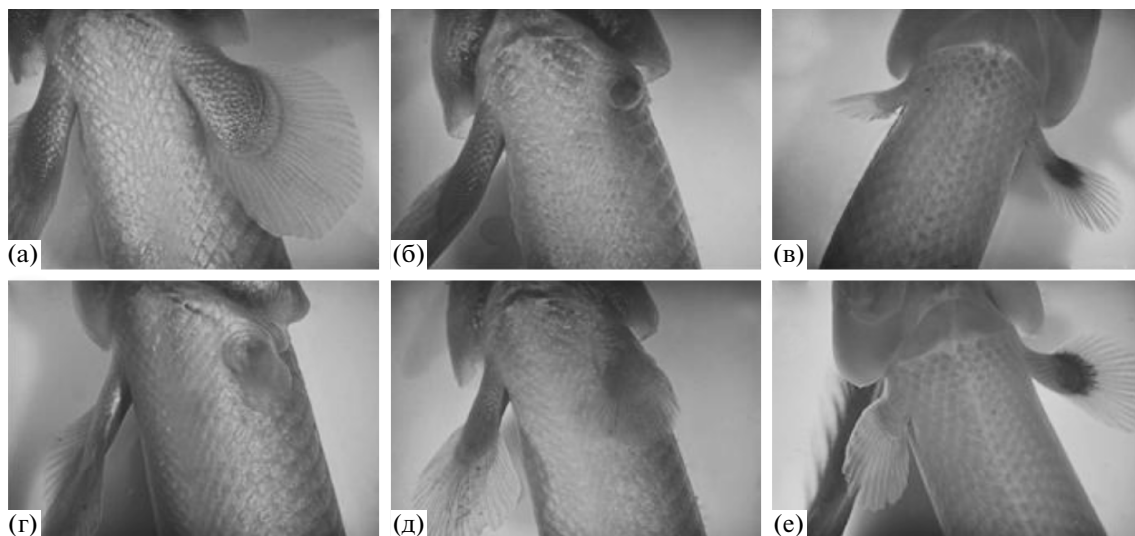


Рис. 2. Регенерация грудных плавников многоперых: а — интактный грудной плавник *P. senegalus*; б, г, д: восстановление грудного плавника *P. senegalus*; б — формирование регенерационной бластемы; г, д: дифференцировки и рост лопастей грудного плавника; в, е: завершающие стадии регенерации грудного плавника *E. calabaricus*, регенерат отличается менее выраженная пигментация.

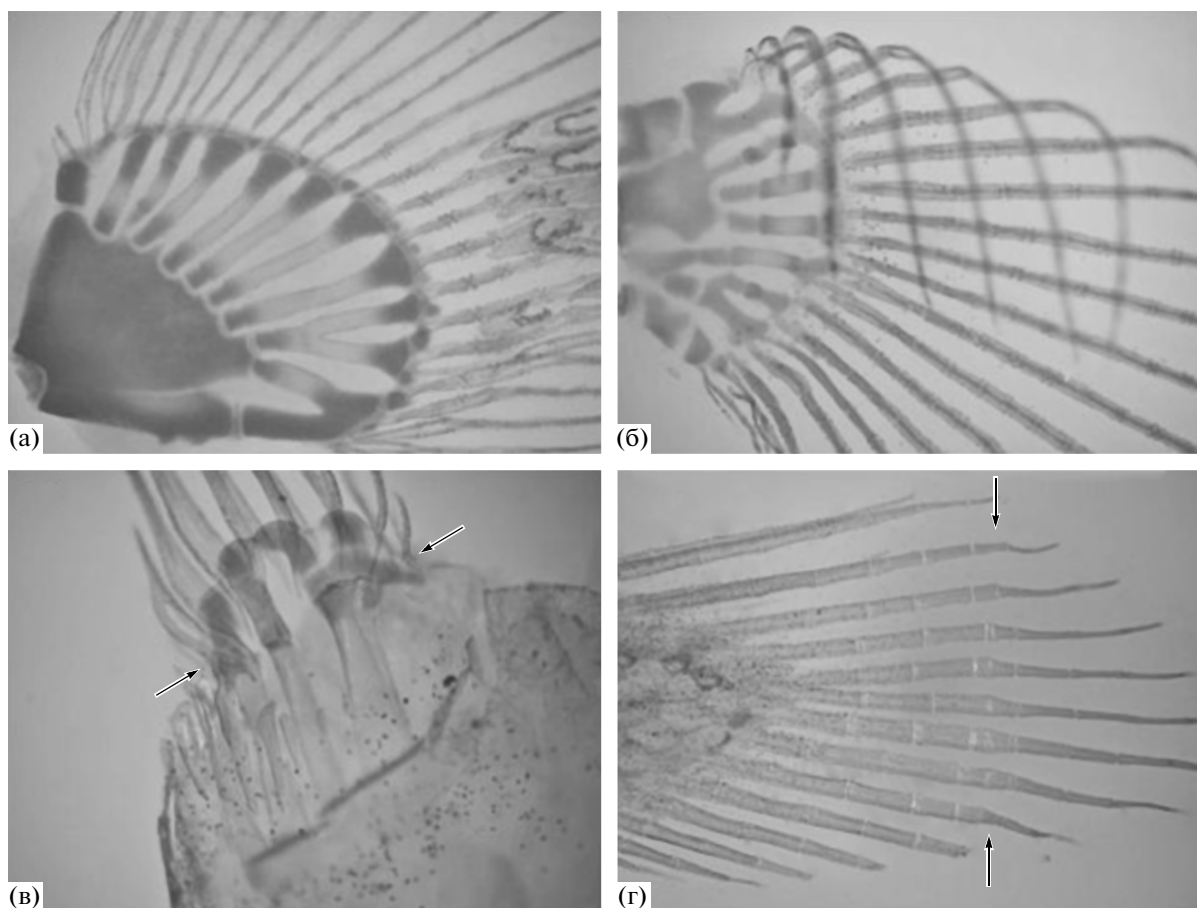


Рис. 3. Морфология скелета плавников после регенерации: а — скелет регенерата грудного плавника *P. senegalus*; б — скелет регенерата грудного плавника *C. calabaricus*; в — скелет регенерата брюшного плавника *P. senegalus*, г — восстановленные костные лучи хвостового плавника *P. senegalus*. Стрелками отмечена граница регенерата и интактной части плавника.

Морфология скелета грудных плавников *P. senegalus* в норме и при регенерации

	Мода, (min–max) признака				
	Число удлиненных радиалий	Число базальных элементов	Число костных лучей	Число радиалий Y-образной формы	Число неполных радиалий
Норма, $N = 30$	16 (12–19)	3	25 (29–39)	0 (0–2)	0 (0–1)
1 регенерация, $N = 30$	11 (7–14)	3 (1–3)	26 (16–35)	1 (0–5)	0 (0–3)
2 регенерация, $N = 30$	9 (7–13)	2 (1–3)	18 (15–30)	1 (0–2)	0 (0–1)

Приведены наиболее часто встречающиеся значения признаков (моды) для интактных грудных плавников *P. senegalus* и их регенератов.

однако в единичных примерах после повторного восстановления эндоскелет утрачивает центральный базальный элемент (рис. 4г), обычно составляющий значительную часть площади эндоскелета плавника. В последнем случае рисунок эндоскелета плавника изменяется: удлиненные радиальные элементы доминируют в эндоскелете. Интересен крайний вариант редуцированного восстановления эндоскелета грудного плавника многоперов, в котором, похоже, реализуется альтернативный и, вероятно, более быстрый способ формирования скелетного каркаса основания регенерата. В этом случае большая часть площади лопасти поддерживается несколькими Y-образными радиальными элементами, непропорционально удлиненными и в некоторых сайтах, как бы, дополнительно укрепленными поперечными перемычками (рис. 4г). При потере центрального базального элемента и сокращении числа радиалий аномальный вариант восстановления эндоскелета регене-

ратов многоперов напоминает план эндоскелета основания грудных плавников филогенетически более поздних групп Actinopterygii, осетрообразных панцирниковых (рис. 4д). Таким образом, редуциционные тренды, проявившиеся при регенерации, частично отражают общее направление эволюционных модификаций плавников лучеперых.

Наряду с редуциционными тенденциями восстановления эндоскелета грудного плавника можно отметить варианты атипичной дифференцировки удлиненных радиалий. В норме радиалии контактируют с базальными элементами эндоскелета проксимальным концом, а противоположным – с рядом небольших округлых хрящей, лежащих на границе основания плавника и дистальной лопасти. В регенератах часто формируются неполные радиальные элементы, один из концов которых лежит свободно (рис. 4б). Кроме того, если в норме радиалии представлены ветвящимися лучами, в

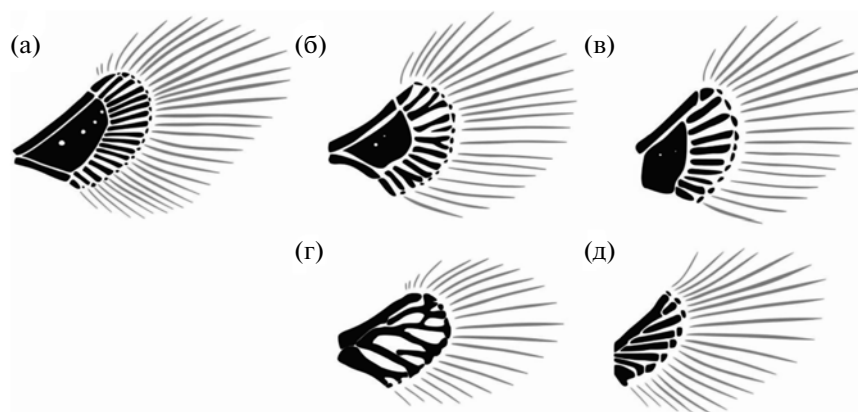


Рис. 4. Редуциционные тренды в регенерации: ряд а – в отражает нарастание редуциционных тенденций при повторных регенерациях грудного плавника *P. senegalus*; а – схема строения скелета интактного грудного плавника *P. senegalus*; б – схема строения скелета грудного плавника *P. senegalus* после первой регенерации; в – схема строения скелета грудного плавника *P. senegalus* после повторной регенерации; г – вариант крайне редуцированного восстановления эндоскелета грудного плавника *P. senegalus*, характеризующийся потерей трибазального состояния; д – схема строения скелета грудного плавника *Polyodon spathula* по Девис и др. (Devis et al., 2004).

восстановленных плавниках они могут приобретать Y- или U-образную форму (рис. 3а, 3б), а также соединяться поперечными элементами (рис. 4г).

ОБСУЖДЕНИЕ

Возможность эффективного восстановления эндоскелета и мускулатуры парных плавников объединяет многоперовых рыб и различных представителей хвостатых амфибий, о феноменальной способности регенерации конечностей которых широко известно (Nye et al., 2003; Alvarado, Tsonis, 2006). Также как при регенерации конечности саламандр и тритонов в начале прогрессивной фазы восстановления плавников многоперовых на ампутированной поверхности формируется регенерационная бластема. Обычно бластему, несмотря на иное происхождение ее клеточного источника, сравнивают с почкой конечности. Далее как при нормальном развитии конечности в ходе регенерации *de novo* формируются утраченные структуры. У хвостатых амфибий регенерационные морфо- и гистогенезы конечности схожи с процессом формирования соответствующих структур конечности в индивидуальном развитии (Bryant et al., 2002). Сохранение исходных анатомических особенностей плавников многоперовых после их регенерации, а так же внешний ход регенерации указывают на частичное воспроизведение нормальной морфогенетической программы развития плавников при регенерации. Однако проверка данного положения требует более детальных исследований.

Успешное восстановление трех типов плавников, включая морфологически специализированные грудные плавники, и менее функционально важные и специализированные брюшные свидетельствует о том, что высокий регенерационный потенциал не является прямым следствием специализации или их функциональной значимости, а скорее представляет их общее свойство. Последнее также подтверждает факт регенерации грудных плавников у каламоихта, которые утрачивают функцию опорных конечностей, вследствие модификации общего плана строения вида.

Возможность восстановления костных лучей широко распространена среди различных семейств лучеперых рыб (Wagner, Misof, 1992) и многоперовые рыбы, демонстрируя эффективную регенерацию свободной лопасти хвостового плавника, вместе со всеми костными лучами, не являются исключением. Однако их способность к регенерации основания парных плавников, включая сложно организованный эндоскелет и мускулатуру, выходит за привычные границы регенерационных потенции лучеперых. Это необычное свойство позволяет рассмотреть представителей Polypteridae в качестве модельных объектов изучения механизмов регенерации проксимальных структур парных

плавников лучеперых. Кроме того, способность многоперов восстанавливать грудной плавник целиком, дает возможность сопоставления регенерации гомологичных структур парной конечности (эндоскелета и скелетной мускулатуры) в двух филогенетически различных таксонах низших позвоночных – лучеперых рыб и хвостатых амфибий. Последнее, помимо возможности выявления консервативных механизмов регенерации, и с учетом ключевой позиции многоперовых рыб в филогенетической системе позвоночных, также связано с проблемой происхождения и эволюции механизмов регенерации парной конечности. Вопрос о происхождении феномена эпиморфной регенерации плавников внутри Actinopterygii в отсутствие сведений о регенерации базальных представителей не имеет однозначного решения, поскольку показано, что разные Teleostei (костистые рыбы) демонстрируют весь спектр регенерационных способностей: от полного отсутствия регенерации – некоторые представители семейства Blenniidae (Wagner, Misof, 1992), до возможности многократного восстановления утраченных частей – *Danio rerio* (Azevedo, Saúde, 2010). Если, проявляя высокий регенерационный потенциал, многоперовые демонстрируют базовое свойство группы, то вполне возможно, что способность лучеперых рыб к эпиморфной регенерации плавников могла возникнуть задолго до появления и радиации Teleostei (костистых рыб), так как Polypteriformes согласно современной оценке, представляют эволюционно раннюю линию таксона Actinopterygii (Noack et al., 1996; Venkatesh et al., 2001).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Казанцев В.П. Гистологические исследования процессов регенерации при ампутации хвостового стебля и грудных плавников у мальков лосося (*Salmo salar* L.) // Труды лаборатории экспериментальной зоологии и морфологии животных академии наук СССР. 1935. Т. IV. С. 57–97.
- Кудокоцев В.П., Силкина М.В. Регенерационные процессы после ампутации заднего конца тела у костистых рыб // Биологические науки. 1967. № 6. С. 39–42.
- Akimenko M.A., Mary-Beffa M., Becerra J., Géraudie J. Old questions, new tools, and some answers to the mystery of fin regeneration // Dev. Dyn. 2003. V. 226. P. 190–201.
- Alvarado A.S., Tsonis P.A. Bridging the regeneration gap: genetic insights from diverse animal models // Nat. Rev. Genet. 2006. V. 7. P. 873–884.
- Azevedo A., Saúde L. Effect of repeated amputation in the zebrafish caudal fin regeneration // EMBO Conference Series “Molecular and cellular basis of regeneration and tissue repair”. Sesimbra. 2010. P. 86.
- Bryant S.V., Endo T., Gardiner D.M. Vertebrate limb regeneration and the origin of limb stem cells // Int. J. Dev. Biol. 2002. V. 46. P. 887–896.

- Davis M.C., Shubin N.H., Force A. Pectoral fin and girdle development in the basal actinopterygians *Polyodon spathula* and *Acipenser transmontanus* // Journal of Morphology. 2004. V. 262. P. 608–1628.
- Galis F., Wagner G.P., Jockusch E.L. Why is limb regeneration possible in amphibians but not in reptiles, birds, and mammals? // Evolution and development. 2003. V. 5. P. 208–220.
- Goss R.G., Stagg M.W. The regeneration of fins and fin rays in *Fundulus heteroclitus* // J. Exp. Zool. 1957. V. 137. P. 487–507.
- Iovine M.K. Conserved mechanisms regulate outgrowth in zebrafish fins // Nat. Chem. Biol. 2007. V. 3. P. 613–618.
- Kirschbaum F., Meunier F.J. Experimental regeneration of the caudal skeleton of the Glass knifefish, *Eigenmannia virescens* (Rhamphichthyidae, Gymnotoidei) // J. of Morph. 1981. V. 168. P. 121–135.
- Morgan T.H. The physiology of regeneration // J. Exp. Zool. 1906. V. 3. P. 457–500.
- Morril C.V. Regeneration of certain structures in *Fundulus heteroclitus* // Biol. Bull. 1906. V. 12. P. 11–20.
- Noack K., Zardoya R., Meyer A. The complete mitochondrial DNA sequence of the bichir (*Polypterus ornatipinnis*), a basal ray-finned fish: ancient establishment of the consensus vertebrate gene order // Genetics. 1996. V. 144. P. 1165–1180.
- Nye H.L., Cameron J.A., Chernoff E.A., Stocum D. Regeneration of the urodele limb: a review // Dev. Dyn. 2003. V. 226. P. 280–294.
- Padhi B.K., Joly L., Tellis P., Smith A., Nanjappa P., Chevrette M., Ekker M., Akimenko M.A., Screen for genes differentially expressed during regeneration of the zebrafish caudal fin // Dev. Dyn. 2004. V. 231. P. 527–541.
- Poss K.D., Keating M.T., Nechiporuk A. Tales of regeneration in zebrafish // Dev. Dyn. 2003. V. 226. P. 202–210.
- Rousseaux C.G. Automated differential staining for cartilage and bone in whole mount preparation of vertebrates // Stain Technol. 1985. V. 60. P. 295–297.
- Tal T.A., Franzosa J.A., Tanguay R.L. Molecular signaling networks that choreograph epimorphic fin regeneration in zebrafish – a mini review // Gerontology. 2010. V. 56. P. 1615–1633.
- Venkatesh B., Erdmann M.V., Brenner S. Molecular synapomorphies resolve evolutionary relationships of extant jawed vertebrates // PNAS. 2001. V. 98. P. 11382–11387.
- Wagner G.P., Misof B.Y. Evolutionary modification of regenerative capability in vertebrates: a comparative study on teleost pectoral fin regeneration // J. Exp. Zool. 1992. V. 261. P. 62–78.
- Wunder W. Versuche ber die Ausheilung von Verletzungen beim Karpfen (*Cyprinus carpio* L.) // Wilhelm Roux's Archives of. Entw.-mech. 1938. V. 137. P. 540–559.

Characteristics of the Reparative Regeneration of Fins in the Polypterid Fish (Polypteridae, Actinopterygii)

A. I. Nikiforova and V. A. Golichenkov

Department of Embryology, Faculty of Biology, Moscow State University, Moscow, 119234 Russia
e-mail: alyonanmsu@gmail.com

Abstract—Epimorphic regeneration of fins was studied in different ray-finned fishes (Actinopterygii), but species representing the phylogenetically basal lineages of the taxon have remained outside the attention of researchers. Information on the regenerative abilities of these groups is important both for understanding the evolutionary origins of the epimorphic regeneration phenomenon and for assessing the universality of regenerative potencies in Actinopterygii. Addressing this problem, we studied for the first time fin regeneration in two members of the archaic family Polypteridae: the ropefish (*Erpetoichthys calabaricus*) and the Senegal bichir (*Polypterus senegalus*). Along with the ability to regenerate the bony rays of fins, widespread among Actinopterygii, polypterids show the ability to effectively regenerate the endoskeleton and musculature of their fins. This unusual feature allows us to suggest polypterids as new model organisms for the study of the mechanisms of vertebrate limb regeneration.

Keywords: fin regeneration, ray-finned fishes, bichirs, endoskeleton, fin bony rays.