

	<i>Название статьи</i>	<i>Страницы</i>	<i>Цит.</i>
<input type="checkbox"/>	<i>ТЕЗИСЫ ДОКЛАДОВ КОНФЕРЕНЦИИ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ ИНСТИТУТА БИОЛОГИИ РАЗВИТИЯ ИМ. Н.К. КОЛЬЦОВА РАН (29,30 НОЯБРЯ 2012 Г.)</i>	<i>223</i>	<i>0</i>
БИОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ ПОЗВОНОЧНЫХ			
<input type="checkbox"/>	<i>ИНДИВИДУАЛЬНАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ РАЗВИТИЯ СЕРОЙ ЖАБЫ BUFO BUFO(ANURA, BUFONIDAE). 1. СРОКИ РАЗВИТИЯ И ОТКЛОНЕНИЯ ВО ВНЕШНЕМ СТРОЕНИИ Коваленко Е.Е., Кружкова Ю.И.</i>	<i>240</i>	<i>0</i>
<input type="checkbox"/>	<i>ИНДИВИДУАЛЬНАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ РАЗВИТИЯ СЕРОЙ ЖАБЫ BUFO BUFO(ANURA, BUFONIDAE). 2. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ПРИЗНАКИ ОСЕВОГО СКЕЛЕТА Коваленко Е.Е., Кружкова Ю.И.</i>	<i>249</i>	<i>0</i>
<input type="checkbox"/>	<i>ИНДИВИДУАЛЬНАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ РАЗВИТИЯ СЕРОЙ ЖАБЫ BUFO BUFO(ANURA, BUFONIDAE). 3. ОГРАНИЧЕНИЯ ИНДИВИДУАЛЬНОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ И ИХ ПРИЧИНЫ Коваленко Е.Е., Кружкова Ю.И.</i>	<i>265</i>	<i>0</i>
БИОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ РАСТЕНИЙ			
<input type="checkbox"/>	<i>НАЧАЛЬНЫЕ ЭТАПЫ РАЗВИТИЯ КОРНЕВЫХ СИСТЕМ У ТРЕХ ВИДОВ НЕДОТРОГ IMPATIENS (BALSAMINACEAE) Марков М.В., Юсуфова В.З.</i>	<i>280</i>	<i>2</i>
ГАМЕТОГЕНЕЗ			
<input type="checkbox"/>	<i>РОЛЬ ОВОДНЕНИЯ В ОВУЛЯЦИИ ООЦИТОВ ТРАВЯНОЙ ЛЯГУШКИ IN VITRO Скоблина М.Н.</i>	<i>287</i>	<i>0</i>
ПОТЕРИ НАУКИ			
<input type="checkbox"/>	<i>ГЕННАДИЙ АЛЕКСЕЕВИЧ БУЗНИКОВ (1931-2012) Шмуклер Ю.Б.</i>	<i>298</i>	<i>0</i>

УДК 591

ТЕЗИСЫ ДОКЛАДОВ КОНФЕРЕНЦИИ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ ИНСТИТУТА БИОЛОГИИ РАЗВИТИЯ им. Н.К. КОЛЬЦОВА РАН (29–30 НОЯБРЯ 2012 г.)

DOI: 10.7868/S0475145013040101

МУТАГЕНЕЗ И СТАБИЛЬНОСТЬ РАЗВИТИЯ *DROSOPHILA MELANOGASTER*: ПОСЛЕДСТВИЯ КОСМИЧЕСКОГО ПОЛЕТА

© 2013 г. Д. В. Анисифоров

Лаборатория генетики

За прошедшие пятьдесят лет освоения космоса было проделано большое количество экспериментов на биологических объектах. Однако известно очень мало работ, в которых проводилась популяционно-генетическая оценка характера воздействия неблагоприятных факторов космического полета. Поэтому нередко на первый план выходят эксперименты с модельными объектами, например, *Drosophila melanogaster*. Важным аргументом в пользу использования дрозофилы является короткий цикл развития (10–14 суток), а также простота содержания и проведения экспериментальных процедур.

Использование дрозофил дает возможность проверить негативное влияние неблагоприятных факторов космического полета на мутагенез и стабильность развития. В качестве меры стабильности развития животных обычно используется флуктуирующая асимметрия (ФА) – параметр, измеряющий ненаправленные случайные отклонения от билатеральной симметрии. Очевидная биологическая интерпретация и легкость измерения делают этот параметр особенно привлекательным для исследования неблагоприятных факторов космического полета. Однако для модельного объекта – дрозофилы, вопрос об эффекте экстремальных условий на ФА остается открытым. Практически все работы, в которых исследовалось влияние экологических стрессов на ФА, проводились в ла-

бораторных условиях. Целями данного исследования являлись: 1) определение степени воздействия ионизирующего излучения во время космического полета на линии *D. melanogaster* различного происхождения; 2) изучение зависимости ФА исследуемых линий *D. melanogaster* от неблагоприятных факторов космического полета (физические перегрузки, ионизирующее излучение, длительное нахождение в условиях невесомости).

В результате проведения многолетнего эксперимента на линиях *Drosophila melanogaster* различного происхождения была выявлена зависимость характера влияния неблагоприятных факторов на мутагенез от происхождения линий. Например, если в линиях лабораторного содержания происходило достоверное увеличение доли доминантных летальных мутаций (ДЛМ) в 1.5–2.5 раза, причем независимо от уровня гетерозиготности по house-keeping генам, то у потомков мух, отловленных в природе, доля ДЛМ осталась на уровне контроля: космос – 0.025, Земля – 0.027. Исследование стабильности развития посредством измерения ФА формы крыла, и использования методов геометрической морфометрии показало, что неблагоприятные факторы космического полета оказали значимое отрицательное влияние на стабильность развития. Методы классической морфометрии такого результата не показали.

ИЗУЧЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕХАНИЗМОВ МОРФОГЕНЕЗА СЕТЧАТКИ

© 2013 г. И. Н. Болмазова

Лаборатория молекулярно-генетических механизмов онтогенеза

Накопленные к настоящему времени данные свидетельствуют, что развитие глаза контролируется иерархией генов, регуляция которых осуществляется строго в пространстве и времени. Для правильного формирования глаза необходима согла-

сованная работа селективно экспрессирующихся транскрипционных факторов семейств Pax/Rx, Pax, Six, Otx, Vsx/Chx и др. На стадии поздней гаструлы/ранней нейрулы глазное поле характеризуется активацией этих генов. Ранее получены дан-

ные, указывающие на определяющую роль гена *Raxb* в развитии глаза у представителей всех изученных систематических групп (Gehring, 1996). В настоящее время большой интерес для исследователей глаза представляют гены семейства *Rx*. Показано, что у эмбрионов мышей с нокаутом гена *mRx* не формируется глазной пузырь, хотя у эмбрионов с мутацией *Small eye* (по *Raxb*) он формируется (Grindley et al., 1995). Предполагается, что *Rx* в генетическом каскаде находится выше *Raxb* (Travis et al., 2004).

Целью данного исследования является пространственно-временная характеристика генов семейств *Rax* и *Vsx/Chx* в ходе морфогенеза сетчатки кур. Гены семейств *Rax/Rx* и *Vsx/Chx* играют важную роль в морфогенезе сетчатки. Структура этих генов позвоночных и беспозвоночных довольно консервативна. Количество генов варьирует у разных видов. Паттерн экспрессии *этих генов у разных видов сходен, но не идентичен. С мутациями генов Rax/Rx и Vsx/Chx связывают возникновение микрофтальмии, катаракты и др. аномалий развития глаза. В настоящее время с помощью ПЦР – ана-*

лиза со специфическими праймерами нами идентифицированы транскрипты *cRaxL* в сетчатке эмбрионов кур с 6 по 18 сут развития. Экспрессия *Vsx2* выявляется на 4–18 сут. Уровень экспрессии имеет тенденцию к увеличению с 4 по 8 сут, и сопоставим с таковым гена маркера фоторецепторов родопсином (*RHO*). Методом иммуногистохимии экспрессия другого члена семейства *Rax*, *cRax*, наблюдается на ранних стадиях развития эмбрионов кур: 3–5 сут – во всей не дифференцированной сетчатке, к 7 сут – в основном в ганглиозных клетках, а на 8 сут – в периферической сетчатке. На более поздних стадиях наличие белка *cRax* не выявлено. Полученные данные могут указывать на участие *cRax* в регуляции дифференцировки ганглиозных клеток. Дальнейшие исследования генов семейств *Rax/Rx* и *Vsx/Chx* необходимы для понимания генетического контроля формирования сетчатки позвоночных и причин возникновения аномалий развития глаза.

Программа президиума РАН “Живая природа: современное состояние и проблемы развития”, РФФИ № 11-04-00728.

ЖАСМОНОВАЯ КИСЛОТА ВЫЗЫВАЕТ УСИЛЕНИЕ БЕЛКОВОГО СИНТЕЗА И ИНДУКЦИЮ АПОПТОЗА В НОРМАЛЬНЫХ И ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ ЭПИДЕРМОИДНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

© 2013 г. М. С. Вильданова, М. Г. Фомичева, Г. Е. Онищенко, Е. А. Смирнова

МГУ им. М.В. Ломоносова, кафедра клеточной биологии и гистологии

Жасмоновая кислота – растительный гормон, участвующий в ответе растений на повреждение или внедрение патогена и оказывающий физиологическое действие на клетки животных. Известно, что жасмоновая кислота селективно подавляет пролиферацию некоторых типов трансформированных клеток млекопитающих, вызывая их гибель по митохондриальному пути, однако механизмы действия данного агента в клетках эпидермоидного происхождения изучены недостаточно хорошо. В качестве объектов исследования использовались культивируемые клетки эпидермоидной карциномы человека А431 и кератиноциты НаСаТ. Жизнеспособность клеток оценивали с помощью МТТ-теста после 24 ч инкубации клеток в присутствии разных концентраций растительных гормонов. Анализ данных показал, что жасмоновая кислота в концентрации 2 мМ вызывала гибель около 30% популяции клеток А431 и НаСаТ. На препаратах, окрашенных гематоксилином и эозинном, было установлено, что наблюдаемый тип клеточной гибели – апоптоз. Однако на иммуноцитохимическом уровне показано, что выхода цитохрома С из митохондрий не происходит, и гибель

клеток не сопровождается повышением содержания активных форм кислорода. Эти данные свидетельствуют о том, что апоптоз идет не по митохондриальному пути. Механизм апоптоза может быть обусловлен стрессом вакуолярной системы, на что указывают изменения морфологии ЭПР и комплекса Гольджи, выявленные на иммуноцитохимическом и ультраструктурном уровне. Однако данные, полученные с помощью метода Click-It (Click-It АНА Alexa Fluor 488 Protein Synthesis HCS Assay), показывают, что при действии жасмоновой кислоты в обеих клеточных линиях в 2 раза возрастает интенсивность белкового синтеза, следовательно изменения в морфологии ЭПР могут быть не связаны с его стрессом.

Полученные результаты показывают, что жасмоновая кислота подавляет пролиферацию клеток А431 и НаСаТ и вызывает их гибель, которая сопровождается усилением общего белкового синтеза. При этом наблюдается клеточная гибель по типу апоптоза, который происходит не по митохондриальному пути.

НАРУШЕНИЕ ЦЕЛОСТНОСТИ ЭЛЕМЕНТОВ ЦИТОСКЕЛЕТА ИНГИБИРУЕТ ПРОЦЕССЫ КЛЕТОЧНОГО КАННИБАЛИЗМА В КУЛЬТИВИРУЕМЫХ КЛЕТКАХ A431

© 2013 г. А. С. Гаранина, Г. Е. Онищенко

МГУ им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, кафедра клеточной биологии и гистологии

В многоклеточных организмах пролиферация и гибель клеток тщательно скоординированы. У человека дисбаланс в этих процессах может привести к различным заболеваниям. Помимо достаточно хорошо охарактеризованного апоптоза, в последние годы внимание ученых привлечено неапоптотический процесс гибели клеток – клеточный каннибализм (КК). Существует гипотеза, что в основе КК лежит активное проникновение одной клетки внутрь другой за счет акто-миозинового сокращения. Однако эти данные получены лишь на клетках, находящихся в суспензии. В связи с этим целью работы было исследовать роль цитоскелета в процессе КК в субстратзависимой культуре клеток эпидермоидной карциномы человека A431. В работе использованы методы световой, флуоресцентной, конфокальной, трансмиссионной и сканирующей электронной микроскопии (ТЭМ и СЭМ). При исследовании актинового цитоскелета клеток выявлено, что на ранних стадиях КК в местах контакта поглощенной и поглощающей клеток присутствуют области с высоким содержанием актина. На основании данных, полученных методом СЭМ, предложен гипотетический механизм внедрения одной клетки в другую за счет прикреп-

ления клетки-жертвы к поверхности каннибала и ее погружения в глубокую впадину (кратер) в теле последней. После этого клетка-каннибал формирует псевдоподию, которая закрывает данный кратер сверху. Для установления роли актиновых микрофиламентов и микротрубочек в процессах внедрения одной клетки в другую мы обрабатывали культуру цитохалазином В и нокодазолом, нарушающими сборку этих элементов цитоскелета соответственно. Воздействие каждым из этих агентов привело к полному исчезновению клеток-каннибалов. После отмывки цитохалазина В наблюдалось постепенное увеличение картин КК. Таким образом, можно предположить, что в процессах внедрения одной клетки в другую участвуют как актиновый цитоскелет, так и система микротрубочек. Нами обнаружено, что микротрубочковый цитоскелет также участвует в перераспределении мембранных органелл при КК и, видимо, обеспечивает везикулярный транспорт для увеличения клеточной поверхности, необходимого при внедрении одной клетки в другую.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 11-04-01518-а).

ОСОБЕННОСТИ РЕГУЛЯЦИИ IGF1-ЗАВИСИМОГО ПУТИ ПРИ РАЗВИТИИ ГЕПАТОЦЕЛЛЮЛЯРНОЙ КАРЦИНОМЫ

© 2013 г. Л. С. Зиневич

Лаборатория молекулярно-генетических механизмов онтогенеза

Гепатоцеллюлярная карцинома (ГК) – широко распространенное онкологическое заболевание, характеризующееся быстрой прогрессией, устойчивостью к терапии и неблагоприятным прогнозом. Исследование молекулярно-генетических механизмов развития ГК имеет большое фундаментальное и практическое значение. Известно, что многие первичные опухоли в разных органах вызывают повышение уровня инсулиноподобного ростового фактора 1 типа (Igf1) в крови больных. Механизм данного явления не ясен, но поскольку печень является одним из основных источников Igf1 в организме, предполагается, что первичные опухоли стимулируют выработку Igf1 печенью (Pollak M., 2012). ГК, напротив, характеризуется пониженным содержанием Igf1 в крови (Wu, Zhu, 2011). Однако нами было показано ранее, что в экспериментальной модели ГК у мышей экспрессия Igf1 в опухо-

ли снижалась, а в окружающей опухоль ткани достоверно возрастала (Зиневич, Микаелян, 2012).

Целью данной работы было изучение паракринной и эндокринной функции Igf1 в развитии химически индуцированной ГК у мышей линии C57B6. Для этого была исследована экспрессия локально-активной и циркулирующей изоформ Igf1 в опухоли печени и окружающей ее ткани методом ОТ-ПЦР. Также методом ОТ-ПЦР в реальном времени измеряли общую экспрессию гена Igf1 при остром повреждении и регенерации печени и экспрессию некоторых других генов-участников сигнального каскада Igf1 при развитии ГК. Исследование экспрессии изоформ Igf1 не выявило явного преобладания эндокринной или паракринной функции Igf1 в регуляции ГК, поскольку было показано одновременное изменение экспрессии обеих изо-

форм. Также было показано, что повышение экспрессии Igf1 в ткани печени специфично для ГК и не связано с регенерацией или эндокринной функцией печени. Кроме того, в ГК возобновляется экспрессия эмбриоспецифического фактора Igf2.

Механизм и функции стимуляции первичной опухолью выработки Igf1 в печени являются темой дальнейших исследований.

Работа поддержана Российским Фондом Фундаментальных исследований (грант № 10-04-01559a).

ВЛИЯНИЕ ДЛИТЕЛЬНОГО ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОГО ВЫКЛЮЧЕНИЯ СИНТЕЗА ДОФАМИНА В МОЗГУ НЕОНАТАЛЬНЫХ КРЫС НА УРОВЕНЬ ДОФАМИНА В ПЛАЗМЕ КРОВИ И СЕКРЕЦИЮ ПРОЛАКТИНА ГИПОФИЗОМ

© 2013 г. Ю. О. Зубова

Лаборатория гормональных регуляций

Данная работа посвящена проверке нашей гипотезы, согласно которой мозг в онтогенезе до формирования межнейрональных синаптических связей и гематоэнцефалического барьера, функционирует как эндокринный орган, участвующий в регуляции развития и функционирования периферических органов и целостного организма.

Цель данной работы — показать, что длительное выключение дофамина (ДА) в мозгу неонатальных крыс влияет на уровень ДА в периферической крови и секрецию пролактина гипофизом.

Для этого нами была разработана модель длительного фармакологического выключения синтеза ДА в мозгу при сохранении его уровня в периферических источниках с помощью 6-гидроксидофамина (6-ГДА) — специфического нейротоксина дофаминергических нейронов. В предварительных экспериментах по системному введению 6-ГДА нами была выбрана доза 100 мкг, которая позволила исключить влияние ингибитора на метаболизм ДА в периферических органах. В последующих экспериментах крысам на второй день постнатального развития в желудочки мозга стереотаксически вводили 100 мкг 6-ГДА, после чего

уровень катехоламинов оценивали с помощью метода высокоэффективной жидкостной хроматографии с электрохимической детекцией в мозгу, почках, желудке, двенадцатиперстной кишке и плазме крови. Показано, что через 72 ч после введения 6-ГДА происходит снижение уровня ДА в мозгу на 44% и в плазме на 72% при неизменном его уровне в периферических органах.

В следующей серии экспериментов на разработанной модели мы изучали влияние дефицита ДА в мозгу на периферические органы. В качестве мишени был выбран аденогипофиз. Через 72 ч после введения токсина в желудочки мозга оценивали уровень пролактина в гипофизе и плазме крови с помощью иммуноферментного анализа. Предварительные результаты свидетельствуют о повышении уровня пролактина в плазме и гипофизе.

Таким образом, разработанная нами модель позволила показать, что дофамин, поступающий из мозга в периферическую кровь, оказывает влияние на секрецию пролактина гипофизом. Полученные данные так же подтверждают нашу гипотезу о том, что в раннем постнатальном периоде мозг функционирует как эндокринный орган.

ИЗУЧЕНИЕ ФОРМИРОВАНИЯ МЕЗЕНОСФЕРОИДОВ ИЗ СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

© 2013 г. И. М. Зурина¹, Н. В. Кошелева^{1,2}, А. А. Горкун¹, И. Н. Сабурин¹

¹Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии РАН

²МГУ им. М.В. Ломоносова, биологический факультет

Исследование мезенхимных стромальных клеток человека и животных в культуре привело к открытию пластичности 3D-сфероидов с автоматической обратимой конверсией стромальных клеток в эпителий и активацией генов плюрипотентности.

В нашей работе впервые показано, что источником сфероидов могут служить диссоциированные соматические клетки из разных тканей и органов взрослого организма — костного мозга, под-

кожной жировой ткани (СКЖТ), кожи, букального эпителия, слизистой оболочки носа, пульпы зуба, ретинального пигментного эпителия (РПЭ) и др., а также из экстраэмбриональных тканей — пупочного канатика (ММСК ПК) и ворсинок хориона термальной плаценты. Целью нашей работы было сравнительное изучение динамики формирования, роста и компактизации сфероидов из разных соматических клеток.

Сфероиды из СКЖТ, РПЭ, фибробластов, ММСК ПК и цитотрофобластов получали в системе “висячая капля” или с использованием разработанной нами методики масштабирования на планшетах (Microtissues™, США). Методами иммуноцитохимии, гистологии, трансмиссионной и сканирующей электронной микроскопии было показано, что сфероиды обладали сходной динамикой формирования как в каплях, так и на планшетах: образование единого рыхлого агрегата в течение 24 часов и постепенное уплотнение к 4–6 суткам с конечной компактизацией к 7 суткам. В процессе формирования сфероида клетки изменяли свою форму и морфологию: наблюдалась ламинация – формирование внешней эпителиоподобной зоны, состоящей из 2–3 слоев плотно упакованных уплощенных клеток, и внутренней зоны, представленной полигональными отростчатыми

клетками. Одновременная экспрессия в сфероидах маркеров как эпителиального (ламнина, коллагена, Е-кадгерина, цитокератина), так и мезенхимного (виментина, актина) ряда, подтвердила обратимую эпителио-мезенхимную пластичность. Многочисленные микровезикулы в клетках свидетельствовали об активном переносе информации путем экзо- и пиноцитоза, а экспрессия генов плюрипотентности (*Oct4*, *Sox2*, *Nanog*) подтвердила проходящий в сфероидах процесс репрограммирования.

Полученные по нашей методике сфероиды со смешанным эпителио-мезенхимным фенотипом могут быть использованы как модель многофункциональных модулей для изучения сигнальных и клеточных механизмов физиологической регенерации и репарации.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА ГИБРИДНОЙ ПОПУЛЯЦИИ ДВУХ ВИДОВ СУРКОВ *MARMOTA BAIBACINA* И *M. SIBIRICA* В МОНГОЛЬСКОМ АЛТАЕ

© 2013 г. С. Ю. Капустина, О. В. Брандлер

Лаборатория цитогенетики

Для определения видовой принадлежности и выявления особенностей генетического состава популяции сурков в зоне вторичного контакта *Marmota sibirica* и *M. baibacina* в Монгольском Алтае (верховья р. Улагчин-Гол) в рамках работы СРМКБЭ было проведено исследование двух маркерных участков яДНК и одного мтДНК. Места отлова животных фиксировались с помощью GPS-навигаторов.

Видовая специфичность аллелей исследуемых участков генома определялась секвенированием образцов, полученных от животных из удаленных от места контакта частей ареала. Были найдены видоспецифичные замены нуклеотидов, формирующие специфические сайты узнавания для рестриктаз. Генотип каждой особи сурков из зоны контакта был исследован методом рестрикционного анализа.

В выборке из зоны симпатрии были найдены аллели обоих видов каждого из исследуемых маркеров. Большая часть особей (53.45%) имеет в геноме аллели обоих видов в различных комбинациях. Доля генетически “чистых” тарбаганов (41.38%) значительно превышает таковую серых сурков (5.17%).

Гетерозиготность популяции (Ho), рассчитанная для всей выборки в целом, оказалась значительно ниже ожидаемой, что позволяет предположить наличие механизмов, препятствующих взаи-

мопроникновению геномов гибридирующих видов. При этом частота аллелей яДНК *M. sibirica* значительно превосходит *M. baibacina* как в общей выборке, так и в пределах выборки особей с гибридным геномом. В общей выборке количество особей имеющих мтДНК *M. sibirica* вдвое превышает *M. baibacina*. В то же время в выборке особей с гибридным геномом их количество практически равно, что может свидетельствовать о равном участии в гибридизации самок обоих видов и их дочерей.

Анализ видоспецифических акустических (Капустина и др., 2010) и молекулярно-генетических признаков показал, что гибридных особей, выявленных по молекулярно-генетическим признакам значительно больше, чем особей, звуковые сигналы которых имеют гибридные признаки. Сравнение пространственного распределения полученных данных позволяет предположить, что гибридизация чистых форм происходит в ограниченных местах. Гибридные особи не проявляют биотопического предпочтения и успешно участвуют в размножении.

Работа поддержана грантами РФФИ и Подпрограммы “Генофонды и генетическое разнообразие” Программы Президиума РАН “Живая природа: современное состояние и проблемы развития”.

ОЦЕНКА РАЗВИТИЯ ДЕГЕНЕРАТИВНЫХ И КОМПЕНСАТОРНЫХ ПРОЦЕССОВ В КАТЕХОЛАМИНЕРГИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ ПО СКОРОСТИ ВЫВЕДЕНИЯ L-ДОФА ИЗ ПЛАЗМЫ КРОВИ

© 2013 г. А. Р. Ким

Лаборатория гормональных регуляций

Нарушение метаболизма катехоламинов в результате гибели специфических нейронов мозга приводит к развитию болезни Паркинсона. При этом существует длительный скрытый период нейродегенерации, затрудняющий раннюю диагностику, который является следствием включения различных компенсаторных механизмов.

Развитие дегенеративных и компенсаторных процессов в катехоламинергических системах должно приводить к изменению метаболизма предшественника катехоламинов — L-дигидроксифенилаланин (L-ДОФА). Мы предполагаем, что эти изменения можно попытаться проследить, вводя экзогенный L-ДОФА и оценивая скорость его выведения из крови. Создание подобного метода детекции нейродегенерации и является целью данной работы.

Для скрининга основных параметров эксперимента, мы использовали нейротоксическую модель ранней симптомной стадии паркинсонизма у мышей (введение 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина — МФТП). При внутривенном введении L-ДОФА в дозе 500 и 5000 нг и оценке со-

держания вещества в плазме крови через 2.5 мин после введения не было выявлено значимых различий между опытом и контролем. В случае ингибирования периферической декарбоксилазы ароматических аминокислот (одного из основных ферментов метаболизма L-ДОФА), при сохранении тех же доз и времени, различия между опытными и контрольными животными также отсутствовали.

Учитывая полученные результаты, мы планируем продолжить поиск других временных интервалов, доз и вариантов ингибирования, и после подбора оптимальных условий, перейти к работе с моделями досимптомных стадий паркинсонизма, разработанными в нашей лаборатории.

Разработка метода детекции нейродегенерации с помощью анализа содержания L-ДОФА в крови после экзогенного введения, позволит не только глубже понять механизмы дегенеративных и компенсаторных процессов в катехоламинергических системах при патологии, но и может послужить основой для создания удобных способов досимптомной диагностики болезни Паркинсона.

ВЛИЯНИЕ НЕЙРОПРОТЕКТОРА НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ СОХРАНИВШИХСЯ ДОФАМИНЕРГИЧЕСКИХ НЕЙРОНОВ НИГРОСТРИАТНОЙ СИСТЕМЫ НА МОДЕЛИ РАННЕЙ СИМПТОМНОЙ СТАДИИ ПАРКИНСОНИЗМА У МЫШЕЙ

© 2013 г. А. А. Колачева

Лаборатория гормональных регуляций

Дегенерация дофаминергических (ДА-ергических) нейронов нигростриатной системы приводит к социальнозначимому заболеванию — болезни Паркинсона. Данное заболевание долгое время (20–30 лет) протекает бессимптомно, и лечение начинается только после первых проявлений болезни и сводится к снижению моторных нарушений. Очевидно, что поиск новых лекарственных препаратов должен быть направлен на защиту сохранившихся и замедление темпов дегенерации уже поврежденных нейронов.

В данной работе была использована разработанная нами модель ранней симптомной стадии паркинсонизма у мышей, полученная при четырехкратном введении предшественника нейротоксина — метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина (МФТП). Такое введение вызывает дегенерацию 43% ДА-ергических нейронов в черной субстанции и снижение уровня дофамина в стри-

туме на 75% через две недели после введения МФТП. Первая задача состояла в том, чтобы оценить динамику функциональной активности сохранившихся ДА-ергических нейронов в первые сутки после введения МФТП методом иммуногистохимического выявления тирозингидроксилазы, основного фермента синтеза ДА. Показано, что через 3 ч после последнего введения МФТП не происходит изменения количества функционально активных ДА-ергических нейронов в черной субстанции по сравнению с контролем, в то время как через 6, 12 и 24 ч и через 14 сут происходит снижение на 33, 41, 31 и 43% соответственно. В связи с тем, что количество иммуноположительных нейронов после 6 часов не меняется до 14 дня, когда все нейродегенеративные процессы уже завершены, можно заключить, что все нейроны потерявшие иммунореактивность дегенерируют.

Второй задачей была разработка схемы введения нейропротектора с учетом данной динамики. В качестве предполагаемого нейропротектора в данной работе, был выбран аналог адренокортико-тропного гормона – (4-10)-гептапептид семакса, для которого были показаны антиоксидантный эффект и стимуляция экспрессии эндогенных ростовых факторов. Семакс вводили через час после последней дозы МФТП и оценивали содержание дофамина и его метаболитов в стриатуме и черной

субстанции через 12 ч после последнего введения МФТП с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с электрохимической детекцией. Введение семакса не изменяет содержания дофамина и его метаболитов в нигростриатной системе по сравнению с их содержанием после введения МФТП. Это может быть связано с недостатком времени для осуществления протекторного действия семакса на DA-ергические нейроны.

ПОЛУЧЕНИЕ И КУЛЬТИВИРОВАНИЕ КЛЕТОК НЕРВНОГО ГРЕБНЯ ИЗ ВОЛОСЯНОГО ФОЛЛИКУЛА ЧЕЛОВЕКА И МЫШИ

© 2013 г. А. В. Косых

Лаборатория проблем клеточной пролиферации

Область bulge волосяного фолликула – резервуар эпидермальных стволовых клеток волосяного фолликула – расположена рядом с местом прикрепления сальной железы и имеет вид разрастания (бугорка). В течение цикла волосяного фолликула дегенерации области bulge не происходит. Эти клетки мигрируют из ниши, пролиферируют и дифференцируются в различные типы клеток волосяного фолликула. Кроме того, клетки области bulge участвуют в заживлении ран при повреждении эпидермиса. В области bulge, помимо эпителиальных стволовых клеток, были обнаружены клетки, происходящие из нервного гребня и сохраняющие потенции нейральных стволовых. Разработка методов выделения и культивирования клеток с нейральным потенциалом области bulge позволит охарактеризовать их свойства и оценить возможности их практического применения.

В данной работе были исследованы возможности выделения волосяных фолликулов из кожи с разных областей тела человека, а также различные методики выделения. Была выбрана и модифицирована оптимальная методика для кожи с лобной части головы в районе линии роста волос. В ходе эксперимента было отмечено снижение нейраль-

ного потенциала клеток культуры при длительном культивировании, как у человека, так и у мыши. При использовании методов иммуногистохимии было выявлено, что в культурах клеток, полученных из области bulge волосяного фолликула мыши и человека, содержится субпопуляция клеток, обладающая свойствами нейральных стволовых. Сами культуры клеток гетерогенны, содержат несколько клеточных типов: кроме клеток нервного гребня, в них присутствуют эпидермальные и мезенхимные клетки.

Несомненно, требуются дальнейшие работы по совершенствованию культуральных подходов и характеристике функциональной активности нейральных клеток, полученных из кожи и волосяного фолликула. Нам представляется, что такие исследования актуальны, поскольку кожа является самым легкодоступным источником аутологичного материала для коррекции тканевых и функциональных дефектов с использованием методов клеточных технологий. Кроме того, дальнейшее изучение производных нервного гребня в коже позволит прояснить их функцию в норме и патологии.

ПОИСКИ АНТИФИБРОТИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ. НАЧАЛЬНЫЙ ЭТАП

© 2013 г. К. А. Кулигина, Ю. И. Василегина, Д. С. Налобин, М. Б. Чернышева, Е. А. Супруненко

МГУ им. М.В. Ломоносова, биологический факультет

По статистике, 30% взрослого населения планеты Земля страдают от заболеваний печени различной этиологии. Ежегодно в России умирает около 4000 человек от таких заболеваний, как гепатит, цирроз, жировой и пигментный гепатоз.

Фибротические процессы в печени являются неотъемлемой стадией каждого из вышеперечисленных заболеваний. Массивный некроз гепатоцитов, в сочетании с отложением соединительной

ткани в образовавшихся пространствах – основные характеристики фиброза. Причиной некроза клеток печени, в большинстве случаев, является повышение уровня окислительного стресса в ткани, что приводит к запуску каскада свободнорадикальных реакций и гибели клеток. С другой стороны, основной источник образования коллагена определенного типа в местах некротических изменений – звездчатые клетки печени (клетки Ито),

которые при повышении уровня окислительного стресса способны изменять свою морфологию на миофибробластоподобную (появляется экспрессия миофибробластного маркера – гладкомышечного актина (α -SMA)), и начинают синтезировать преимущественно коллаген I типа. Поиски агентов, действие которых направлено на подавление различных механизмов (или уровней) развития фибротических изменений в тканях, становятся все более актуальными в последние годы. Одним из таких агентов стал гормон эпифиза мелатонин, который, как известно, является мощным антиоксидантом. Именно это свойство мелатонина становится все более привлекательным с точки зрения возможного его применения в антифибротической терапии.

Задачей данного исследования было поэтапное и всестороннее изучение процесса фиброза в печени мышей, а также влияние гормона мелатонина на процессы развития и регрессии фиброза. Эксперимент проводили на самцах мышей C57BL/6J. Фиброз индуцировали внутрибрюшинным введением четыреххлористого углерода 2 раза в неделю в течение 1 мес., доза составила 1 мкл на 1 г веса мыши в виде 30% масляного раствора. В одной из экспериментальных групп на

фоне введения CCl₄, мыши получали с питьевой водой мелатонин в концентрации 20 мкг/г. Забой мышей проводили на 3, 5, 7, 14, 21, 30 сут после 1 инъекции и через 2 месяца после последней. Образцы ткани были подвергнуты гистологическому и иммуногистохимическому исследованию. Гистологическое исследование печени мышей показало динамику развития фибротических изменений в ткани: к 14 сут наблюдалось отложение соединительной ткани в перипортальной зоне, далее образование междольковых септ (21 сут), образование сети септ между дольками к 30 сут эксперимента. Показано положительное влияние гормона мелатонина на замедление развития фиброза в печени мышей.

Иммуногистохимическое исследование выявило уменьшение числа клеток, экспрессирующих α -SMA, в группе мышей с индуцированным фиброзом, получавших мелатонин с питьевой водой, в сравнении с экспериментальной группой без мелатонина. Кроме того, нами было отмечено, что после окончания введения четыреххлористого углерода, происходит постепенное снижение степени распространения коллагеновых тяжей, формирующих септы, т.е. происходит регрессия фиброза в печени мышей.

АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ РЕТРОТРАНСПОЗОНА *Gypsy* В ГИБРИДАХ, ПОЛУЧЕННЫХ ОТ СКРЕЩИВАНИЯ ЛИНИЙ *Drosophila melanogaster*, НЕСУЩИХ МУТАЦИИ В ГЕНАХ *flamenco* И *piwi*

© 2013 г. А. Р. Лавренов, Ф. А. Урусов

Лаборатория молекулярной биологии развития ИБР РАН, лаборатория генетики животных, МГУ им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, кафедра генетики

Мобильный генетический элемент (МГЭ) *gypsy Drosophila melanogaster* является представителем ретротранспозонов с длинными концевыми повторами, имеющих высокую степень сходства с ретровирусами. Транспозиционная активность *gypsy* контролируется геном *flamenco* при помощи механизма РНК-интерференции: предполагается, что ген *flamenco* является источником антисмысловых РНК, взаимодействующих с белком Piwi. Лабораторные изогенные линии MS и SS имеют мутантный фенотип *flamenco*, который характеризуется повышенной частой транспозиции МГЭ *gypsy*. Не исключено, что этот фенотип может быть обусловлен нарушением Piwi-зависимого процессинга РНК-предшественника. Целью данной работы было установить, является ли причиной фенотипа *flamenco* мутация в локусе *flamenco* или же она вызвана мутацией в гене системы РНК интерференции – *piwi*.

Мутации в гене *piwi* в гомозиготном состоянии приводят к резкому снижению жизнеспособности и стерильности таких особей. Чтобы проверить, присутствует ли в наших линиях летальная мута-

ция в гене *piwi*, нами было поставлено 100 индивидуальных скрещиваний самок линии SS (*flamenco*, *w¹*) с самцами линии *piwi*³ (P{PZ}piwi⁰⁶⁸⁴³ cn¹/CyO; *ry*⁵⁰⁶). Ожидалось, что при массовом скрещивании MS или SS с линией *piwi*³ мы можем получить потомство, часть которого унаследует оба нефункциональных гена *piwi* и погибнет. Однако проведенный анализ потомства индивидуальных скрещиваний ♀SS × ♂*piwi*³ опроверг возможность наличия летального аллеля гена *piwi* в исследуемых линиях. Это также было подкреплено тем фактом, что у потомства от данного скрещивания не наблюдалось нарушения морфологии яичников.

Далее для решения поставленной задачи была проанализирована экспрессия *gypsy* у потомков, полученных от скрещиваний линий MS и SS с линией *piwi*³. В результате было обнаружено, что в яичниках гибридов *flamenco/flamenco*+; *piwi*³/*piwi*², полученных как от прямого ♀MS × ♂*piwi*³, так и от обратного скрещивания ♀*piwi*³ × ♂MS наблюдается снижение экспрессии по сравнению с яичника-

ми родительских линий MS и *piwi*³. Аналогичные результаты наблюдались и в скрещиваниях с линией SS. Это позволило сделать вывод, что мутаций в гене *piwi*, приводящих к нарушению его функции, связанных с контролем ретротранспозона *gypsy*, в изогенных линиях MS и SS нет.

Таким образом, причина фенотипа *flamenco* в линиях MS и SS не связана с мутацией в гене *piwi*, а скорее всего, связана либо с нарушением работы самого *flamenco*, либо с мутацией в другом гене, участвующем в процессинге РНК-предшественника.

ОСОБЕННОСТИ ПОСТУПЛЕНИЯ ИОНОВ КАЛЬЦИЯ В ЦИТОПЛАЗМУ В ОТВЕТ НА ДЕЙСТВИЕ АРАХИДОНОВОЙ КИСЛОТЫ В КЛЕТКАХ ЛИНИИ C2C12

© 2013 г. Э. Р. Муслихов

Лаборатория общей физиологии

В последние несколько лет установлено, что в клетках скелетной мускулатуры, наряду с классическим механизмом выброса кальция из саркоплазматического ретикулума в ответ на деполяризацию сарколеммы, реализуются механизмы входа Ca^{2+} из внеклеточной среды, к числу которых относится депо-зависимый транспорт. Ранее в нашей лаборатории было показано, что в депо-зависимом входе Ca^{2+} в скелетных миотубулах участвуют каналы *Orai1* (Авдонин и др., 2008) Еще один представитель этого семейства кальциевых каналов, *Orai3*, также экспрессируется в скелетных мышцах. Известно, что *Orai3* входит в состав каналов ARC, специфическим активатором которых является арахидоновая кислота. Каналы ARC выявлены в ряде клеток (Shuttleworth, 2009), однако механизм, приводящий к их активации, точно не известен. Кроме того, не ясно, есть ли другие пути воздействия арахидоновой кислоты на внутриклеточный кальциевый обмен.

Целью моей работы было определить возможные пути действия арахидоновой кислоты в скелетных миотубулах.

Исследования проводили на культурах клеток линии C2C12 (скелетные миобласты, полученные из бедра задней конечности мыши, коллекция ATCC). Дифференцировку вызывали заменой среды культивирования (DMEM), содержащей 10%

эмбриональной телячьей сыворотки, на среду, содержащую 2% лошадиной сыворотки. Изменения концентрации ионов Ca^{2+} в цитоплазме ($[Ca^{2+}]_{цит}$) отслеживались при помощи флуоресцентного микроскопа с использованием кальциевого зонда Fura-2.

Было показано, что арахидоновая кислота вызывает значительное повышение в миотубулах C2C12. Этот эффект проявляется вне зависимости от содержания ионов Ca^{2+} во внеклеточной среде, т.е. задействованы эндогенные источники — внутриклеточные депо. В недифференцированных миобластах той же линии, повышение $[Ca^{2+}]_{цит}$ при действии арахидоновой кислоты практически незаметно. Для определения мишени, на которую направлено действие арахидоновой кислоты, мы использовали блокаторы ряда каналов, осуществляющих выброс ионов Ca^{2+} из внутриклеточных депо: рианодин-чувствительных каналов, двупоровых каналов (TRP), а также фосфолипазы C, участвующей в активации инозитолтрифосфатных рецепторов. Полученные данные указывают на то, что ключевую роль в повышении $[Ca^{2+}]_{цит}$ при действии арахидоновой кислоты процессе играют рианодин-чувствительные каналы саркоплазматического ретикулума.

РЕПРОГРАММИРОВАНИЕ КЛЕТОК ДЕРМАЛЬНОЙ ПАПИЛЛЫ ЧЕЛОВЕКА ДО ПЛЮРИПОТЕНТНОГО СОСТОЯНИЯ

© 2013 г. И. А. Мучкаева, Э. Б. Дашинимаев, А. С. Артюхов, А. В. Васильев

Лаборатория проблем клеточной пролиферации

Индукцированные плюрипотентные стволовые клетки (иПСК) представляют интерес главным образом благодаря способности к дифференцировке в производные трех зародышевых листков. Нами были получены иПСК из культуры клеток дермальной папиллы взрослого человека, а также из линии фибробластов кожи взрослого человека посредством лентивирусной доставки четырех транскрипционных факторов *Oct4*, *Sox2*, *c-Myc* и *Klf4*.

Для повышения эффективности репрограммирования мы использовали 2-пропилвалериановую кислоту. Через 2 нед мы наблюдали появление первых колоний репрограммированных клеток. Нам удалось выделить несколько Tra-1-60-положительных клонов репрограммированных клеток, что предполагает приобретение ими плюрипотентного статуса. С помощью иммуноцитохимического окрашивания было выявлено, что исследуемые

колонии репрограммированных клеток экспресировали транскрипционные факторы плюрипотентности: OCT4, SOX2, NANOG, а также поверхностные антигены SSEA-3, SSEA-4, Tra-1-60, Tra-1-81. Экспрессия упомянутых поверхностных белков также была подтверждена методом проточной цитофлуориметрии. Все клоны были положительны по экспрессии щелочной фосфатазы – одного из маркеров плюрипотентного статуса клеток, а также по реактивации фермента теломеразы. Методами количественного и качественного ПЦР-анализов нами было показано наличие транскрип-

тов генов, играющих важную роль в раннем эмбриогенезе. Выделенные клоны способны образовывать эмбрионидные тельца, в которых выявляются белки эктодермы (нестин), мезодермы (десмин) и энтодермы (АФП). В культуре показана дифференцировка их в производные трех зародышевых листков. При определенных условиях полученные нами и ПСК человека дифференцируются в нейрональном (PDX1, нестин, бета тубулин III), остеогенном (остеопонтин, остеонектин) и гепатоцитарном (HNF4a, Foxa2, АФП, альбумин) направлениях.

ОСОБЕННОСТИ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК ДЕРМАЛЬНОЙ ПАПИЛЛЫ

© 2013 г. Е. П. Мягкова

Лаборатория проблем клеточной пролиферации

Дермальная папилла (ДП) – мезенхимное образование волосяного фолликула (ВФ), участвующее в регуляции его развития и цикла физиологической регенерации. Отличительной чертой клеток ДП является способность индуцировать новообразование ВФ при трансплантации в афолликулярные участки кожи. Однако эта способность теряется с увеличением времени культивирования. Проблемы с культивированием клеток ДП ограничивают их изучение и применение в медицине.

Клетки культивировали вплоть до 8 пассажа. Оценивали экспрессию специфических маркеров: версикана, щелочной фосфатазы и wnt5a, снижение экспрессии которых соотносится с потерей индуцирующих свойств. В культуру вносили компоненты ниши клеток ДП: факторы роста, регулирующие цикл ВФ, компоненты внеклеточного матрикса (ВКМ) ДП. Использовали культивирование в сферах для воссоздания структуры ДП *in vivo*. Для усиления влияния аутокринного сигнала использовали вальпроевую кислоту (ВПК), которая, являясь ингибитором деацетилазы гистонов, делает хроматин более “доступным” для транскрипционных факторов.

Наиболее эффективным способом увеличения экспрессии маркеров клеток ДП оказалось использование сферических культур и ВПК. При этом при воздействии на культуру позднего пассажа, в которой специфические маркеры экспрессируются на невыявляемом уровне, ВПК и получение сфер из этой культуры экспрессия маркеров восстанавливалась. При исследовании компонентов ниши клеток ДП компоненты ВКМ оказывали незначительный эффект, среди факторов роста наилучшие результаты были показаны для BMP6 и кальцитриола (аналога витамина D3). Но эффект от них снижался с увеличением времени культивирования и к 6-му пассажу исчезал.

По результатам исследования можно сказать, что для получения долговременной культуры клеток ДП необходимо поддерживать собственный аутокринный сигналинг этих клеток.

Исследование факторов, увеличивающих и поддерживающих индуцирующие свойства клеток ДП в культуре, поможет выяснить, какую именно роль играют клетки ДП в образовании и цикле физиологической регенерации ВФ, а также сделает доступным использование клеток ДП в медицине для получения тканеинженерных конструкций.

ВЛИЯНИЕ ИЗМЕНЕНИЯ УРОВНЯ НЕЙРОМЕДИАТОРОВ НА ЦИЛИАРНУЮ ЛОКОМОЦИЮ И РАЗВИТИЕ СВОБОДНОПЛАВАЮЩИХ ЛИЧИНОК МОРСКИХ ЕЖЕЙ

© 2013 г. А. Л. Обухова, Е. Е. Воронежская

Лаборатория сравнительной физиологии

Практически любые изменения во внешней среде воспринимаются сенсорными структурами животных и приводят к изменению уровня соответствующих нейромедиаторов в организме. В зависимости от стимула это приводит к кратковременным изменениям – модуляции поведения, или же долговременным – модификации развития. В

качестве моделей для изучения механизмов, которые обеспечивают весь широкий спектр адаптивных реакций организма, давно и плодотворно используются беспозвоночные животные. В своей работе для исследования влияния уровня моноаминов (серотонина, 5-НТ, и дофамина, DA) на поведение и развитие нами были выбраны свобод-

ноплавающие личинки морского ежа *Strongylocentrotus nudus*.

Личинок *Str. nudus* инкубировали в растворах 5-НТ, DA, их предшественников (5-НТР и L-DOPA) и блокаторе синтеза (PCPA) (10–7 М для всех веществ). Последующее иммунохимическое выявление 5-НТ, DA и ресничных структур с анализом препаратов под конфокальным микроскопом показало изменения в морфологии и содержании медиаторов в 5-НТ- и DA-ергической системах.

Инкубация со стадии бластулы и призмы в PCPA, а также призмы в DA и L-DOPA приводила к блокаде ресничной локомоции и погружению личинок на дно через 8 часов инкубации. Эффект PCPA полностью снимался при помещении личинок в чистую морскую воду и компенсировался добавлением 5-НТР. Эффект от DA и L-DOPA оставался необратимым. Инкубация личинок в 5-НТ и 5-НТР приводила к возрастанию числа активно плавающих особей. Инкубация личинок, как на ранних, так и на более поздних стадиях развития в

DA приводила к замедлению темпов развития вплоть до его полной остановки.

До стадии поздней призмы тело личинок *Str. nudus* равномерно покрыто ресничками, в основании которых выявляются везикулы с высоким содержанием 5-НТ. Дофамин в этих структурах не выявляется. У личинок, упавших на дно, содержание 5-НТ в везикулах значительно ниже, чем у нормально плавающих. Интересно, что аналогичные структуры были выявлены у личинок морского ежа *Hemicentrotus pulcherrimus* (Katow et al., 2010), причем у личинок этого вида, в отличие от изученного нами *Str. nudus*, в подростничных структурах локализован DA, а поведение их в растворе DA аналогично поведению *Str. nudus* в растворе 5-НТ.

Таким образом, 5-НТ и DA оказывают разнонаправленное действие на ресничную локомоцию личинок морских ежей, причем это воздействие различно для личинок разных видов. Дофамин, в отличие от серотонина, замедляет темпы личиночного развития.

Работа поддержана грантами РФФИ № 12-04-01510, № 12-04-10119.

ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ ИММУННЫХ СУБЪЕДИНИЦ И АКТИВАТОРОВ ПРОТЕАСОМ В РАННЕМ РАЗВИТИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫСЫ

© 2013 г. А. Ш. Орлова

Лаборатория биохимии

Регуляция работы убиквитин-протеасомной системы, участвующей в деградации структурных и функциональных белков синапсов, является актуальным вопросом в изучении пластичности центральной нервной системы позвоночных. Целью настоящей работы было изучить возможную связь между экспрессией иммунных протеасом и активаторов PA700, PA28 и PA200 во фронтальной коре, гиппокампе и стволе мозга крысы в периоды эмбрионального (E19–E21) и раннего постнатального (P0–P15) развития. Методом Вестерн-блоттинга определяли уровень экспрессии иммунных (LMP2, LMP7) и конститутивных (β 1, β 5) субъединиц и регуляторов (PA700, PA28, PA200) протеасом, а также оценивали химотрипсинподобную (ХПА) и каспазоподобную (КПА) активности протеасом по гидролизу флуорогенных субстратов Suc-LLVY-AMC и Z-Leu-Leu-Glu-MCA, соответственно.

Содержание субъединиц β 1, β 5 и регулятора PA28 протеасом в коре головного мозга растет в период от E19 до P4, а затем снижается до P15, а в гиппокампе и стволе резко увеличивается в период до P1 и спадает только после P5. На фоне увеличения тотального пула протеасом количество иммунных субъединиц LMP7 в стволе и гиппокампе растет от E21 к P15, и сопровождается увеличением ХПА и КПА. В коре головного мозга содержа-

ние LMP7 увеличивается в период к от E21 до P5, и от P10 до P15, а снижение наблюдается в период P7. В соответствии с изменениями экспрессии субъединицы LMP7 протеасом в коре головного мозга изменяется ХПА и КПА. Количество другой иммунной субъединицы, LMP2 (встраивается независимо от LMP7), имеет схожие изменения во всех структурах мозга: растет в период от E19 к P3, падает на P4 и P7, увеличивается на P5 и P15. Уровень экспрессии PA200 в коре не изменяется, а в гиппокампе и стволе мозга имеет одинаковую динамику роста в периоды от E21 к P3 и от P8 до P15. Экспрессия регулятора PA700 во всех изученных структурах отличалась от экспрессии других регуляторов и субъединиц протеасом.

Таким образом, нами установлено, что в отдельные периоды раннего развития головного мозга крысы происходит смена активаторов PA28 и PA200 протеасом. В период от E19 до P5 активно нарабатываются все изученные активаторы, PA28, PA200 и PA700, совместно с протеасомами, содержащими иммунные субъединицы LMP2 и LMP7. По-видимому, данные структуры в составе протеасом отражают специфические функции убиквитин-протеасомной системы, связанные с особенностями нейрогенеза в этот период.

Работа поддержана РФФИ (грант № 12-04-00072-а).

АНАЛИЗ ИЗМЕНЧИВОСТИ НУКЛЕОТИДНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ПРЕПРОМОТОРНОЙ ОБЛАСТИ ГЕНА *ras1* У БЛИЗКОРОДСТВЕННЫХ ВИДОВ ДРОЗОФИЛ ГРУППЫ *virilis*

© 2013 г. П. А. Прошаков, М. И. Барсуков, А. И. Чекунова

Лаборатория генетики

Исследование полиморфизма регуляторных последовательностей консервативных генов в группах близкородственных видов представляет особый интерес, поскольку позволяет оценить эволюционную динамику изменчивости этих последовательностей.

Мы исследовали предпромоторный район гена *ras1* у дрозофил группы *virilis*, которая является удобной моделью для описания процессов молекулярной эволюции на ранних стадиях дивергенции.

Ген *ras1* является одним из высоко консервативных генов. Продукт его экспрессии — белок Ras1 участвует в регуляции митотической активности клеток. Мутации в этом гене часто приводят к канцерогенезу. Регуляция экспрессии гена *ras1* также эволюционно консервативна.

На данном этапе работы отсеквенированы 3 участка размером 158, 426 и 368 п.о., расположенные сразу перед предполагаемым сайтом начала транскрипции гена (последовательность АТСТСАТСТСА (transcription start site — TSS)) и на расстоянии 160 и 753 нуклеотида соответственно выше него. В эксперименте использовали следующие виды из коллекции лаборатории генетики: *D. montana*, *D. kanekoi*, *D. ezoana*, *D. laticola*, *D. littoralis*, *D. lummei 200*, *D. lummei 1109* и линии *D. virilis*: 2, 9, 12, 103, 113, 119, 135, 149, 151, 175.

Для аналитических работ использовали программное обеспечение Laser Gene, MEGA-5. Последовательности выравнивали методом Clustal-W.

Сравнительный анализ выявил значительный полиморфизм исследуемой области. На отсеквенированном участке были обнаружены нуклеотидные замены, делеции/инсерции различной длины. У вида *D. lummei* обнаружены инсерции в позициях 448 и 480 длиной 22 и 4 нуклеотида соответственно. Также у видов филады *montana* обнаружена общая делеция размером 5 нуклеотидов в позиции 47. Линия *D. virilis 149* отличается от остальных линий этой группы делецией в 4 нуклеотида, находящейся на расстоянии 187 п.о. Отсчет позиций ведется вверх по цепи относительно предполагаемого TSS. По последовательностям участка длиной 426 п.о. была построена дендрограмма филогенетических отношений. В данном участке обнаружен 91 вариабельный сайт, причем 81 из них является филогенетически значимым. 25 полиморфных сайтов позволяют кластеризовать виды филады *montana*. Количество транзиций преобладает на данном участке над количеством трансверсий с соотношением 0.79. Построенная дендрограмма соответствует филогении Трокмортон (Trockmorton, 1982).

РЕГУЛЯЦИЯ МОРФОГЕНЕЗА ХВОСТА ТРИТОНА В НОРМЕ И В УСЛОВИЯХ ИЗМЕНЕННОЙ ГРАВИТАЦИОННОЙ НАГРУЗКИ

© 2013 г. Е. А. Радугина¹, Э. Н. Григорян¹, Н. Дворочкин², Е. Алмейда²

¹ Лаборатория проблем регенерации

² Эймский центр НАСА, США

Хвостатые амфибии уникальны своей способностью восстанавливать утраченные конечности, хвост, ткани глаза, участки сердца и других органов. До сих пор неясно, является ли их регенерационная способность исключением или базовым свойством позвоночных, частично утраченным другими представителями, в том числе человеком. Изучение регуляторных механизмов регенерации, обнаружение в них универсальных и специфических для тритона компонентов позволит решить этот вопрос. Для этого постоянно привлекаются новые методы и модели, в том числе демонстрирующие влияние на регенерацию внешних условий. Давний интерес представляет регенерация в условиях космического полета. В лаборатории проблем

регенерации ИБР РАН показали влияние факторов космического полета на скорость регенерации, пролиферацию клеток и экспрессию некоторых факторов роста у тритона *Pleurodeles waltl*. В экспериментах на борту российских спутников Фотон М2, М3 (2005, 2007 гг.) было обнаружено неожиданное различие формы регенератов хвоста у животных, регенерировавших на орбите и в лабораторных контролях — аквариальном и синхронном, который содержался на влажном субстрате и в полной мере испытывал действие силы тяжести. В последнем случае регенерат хвоста загибался в вентральную сторону, отклоняясь от нормальной ланцетовидной формы.

Этот эффект был многократно воспроизведен в лаборатории. Морфометрический анализ подтвердил достоверность изменения формы хвоста на субстрате, начиная с III стадии регенерации и далее (Iten, Bryant, 1976). В сотрудничестве с Эймским центром НАСА было показано, что центрифугирование с перегрузкой в 2g приводит к загибу регенерата в той же мере, что и содержание на субстрате. Для проверки обратимости загиба животные содержались на субстрате вплоть до появления достоверных отличий от контроля, после чего их возвращали в аквариум. Было показано, что в течение 11 сут у таких животных уменьшился загиб хвоста, и значимое различие между ними и аквариальном контролем исчезло.

Были обнаружены тканевые и клеточные отличия загнутых регенератов от контроля: загиб эпендимной трубки и хрящевого тяжа, утолщение апикального эпидермиса, ориентированное уплотне-

ние дорсальной бластемы. С помощью предшественника синтеза ДНК БрдУ было показано перераспределение пролиферирующих клеток в эпидермисе с преобладанием их в апикальной части, по-видимому, приводящее к ее утолщению. Наши дальнейшие исследования посвящены механизмам, регулирующим эти изменения. На основании имеющихся в литературе данных мы предполагаем, что эффекты изменения гравитационной нагрузки могут опосредовать белки теплового шока — универсальные кошапероны, участвующие во многих процессах развития и в реакции на различные стрессовые воздействия. Изучение их роли в измененном морфогенезе хвоста тритона может предоставить нам новые данные о способах “распознавания” организмом измененного гравитационного воздействия и регуляторных механизмах регенерации в целом.

ПРОЛИФЕРАЦИЯ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКА ЭПИДЕРМАЛЬНЫХ КЛЕТОК У МУТАНТНЫХ МЫШЕЙ С НАРУШЕНИЕМ РАЗВИТИЯ ВОЛОСЯНЫХ ФОЛЛИКУЛОВ

© 2013 г. А. Л. Риппа

Лаборатория проблем клеточной пролиферации

Развитие кожи и волосяных фолликулов в эмбриогенезе мыши начинается на 12.5 сут. В результате пролиферации, дифференциации и стратификации эпидермальных клеток образуется многослойный эпидермис. Базальный слой кератиноцитов контактирует с базальной мембраной и характеризуется высоким пролиферативным потенциалом. Вышележащие слои образованы кератиноцитами на разных стадиях дифференцировки.

Мутантные мыши, двойные гомозиготы *we/we wal/wal*, являются уникальным объектом для изучения морфогенеза кожи, поскольку к 21-м сут постнатального развития все мыши *we/we wal/wal* имеют четко выраженную алопецию. На 18.5 сут эмбрионального развития нами были обнаружены существенные аномалии в развитии кожи и ее придатков у гомозигот *we/we*, *wal/wal* и двойных гомозигот *we/we wal/wal* в сравнении с контрольной линией C57Bl6. На 18.5 сут в норме в волосяном покрове у мыши наблюдаются генерации всех 4 типов волосяных фолликулов на разных стадиях развития. В волосяном покрове мутантов *we/we wal/wal* в это время волосяных фолликулов было значительно меньше, и они запаздывали в развитии.

Исследовав экспрессию маркера базальных кератиноцитов цитокератина 5, мы выявили у мутантов *we/we*, *wal/wal* и *we/we wal/wal* зоны мультипликации базального слоя, которые были наиболее ярко выражены у мутантов генотипа *we/we* и *we/we*

wal/wal. Утолщения базального слоя отчетливо распознавались по нарушению экспрессии Р-кадгерина. В норме Р-кадгерин экспрессируется в базальном слое межфолликулярного эпидермиса и усиленно в краниальной части волосяных фолликулов. У мутантов данный паттерн был нарушен, Р-кадгерин экспрессировался в фолликулоподобных структурах. Наиболее сильные нарушения наблюдали у мутантов *we/we* и *we/we wal/wal*. Анализ экспрессии маркера пролиферирующих клеток Ki-67 показал, что клетки в зонах мультипликации базального слоя пролиферируют без инвагинации в дерму. Данные по экспрессии маркера кератиноцитов зернистого слоя, лорикрина, у всех исследуемых мутантов выявили зоны уменьшения или отсутствия клеток шиповатого слоя, что свидетельствует об их преждевременной дифференциации в кератиноциты зернистого слоя. В очагах скопления пролиферирующих базальных кератиноцитов, эпидермальные клетки синтезировали ламинин 5, перлекан и $\beta 1$ интегрин по всему периметру.

Мы полагаем, что выявленные нарушения являются проявлением мутаций гена *we* и *wal* в эмбриогенезе кожи. Морфологические признаки обеих мутаций на 18.5 сут одинаковы и отличаются лишь по степени выраженности. У двойных гомозигот нарушения морфогенеза кожи усиливаются и возможно являются причиной дальнейшей почти полной потери волос.

МЕХАНИЗМЫ ПОРТАЛЬНОЙ ТОЛЕРАНТНОСТИ: ВОЗМОЖНАЯ РОЛЬ ПРОТЕАСОМ

© 2013 г. А. А. Степанова

Лаборатория биохимии

Портальная толерантность – феномен развития иммунологической толерантности после введения антигенов в воротную вену печени. Начиная с 1990-х годов, в ряде работ было показано увеличение приживаемости и срока жизни тканевых трансплантатов у животных, которым за 7–14 сут до трансплантации в воротную вену печени вводили донорские клетки. Возникает вопрос, как печень может влиять на процесс активного подавления иммунного ответа на пересаженную ткань? В печени эволюционно сформировался свой особенный локальный контроль иммунного ответа, так как к множеству антигенов, поступающих из желудочно-кишечного тракта, организм должен быть толерантен. В роли антиген-презентирующих клеток синусоида могут выступать Купферовские клетки, эндотелиальные клетки синусоида печени (LSEC) и дендритные клетки. Первые два типа клеток тормозят активацию CD8⁺ Т-лимфоцитов (LSEC осуществляют кросс-презентацию антигена), а CD4⁺ Т-лимфоциты после контакта с LSEC приобретают фенотип регуляторных CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Т-лимфоцитов, которые поддерживают развитие иммунологической толерантности. За счет особого профиля цитокинов (ИЛ-10, TGF-β1), обусловленного работой Купфе-

ровских клеток и LSEC, дендритные клетки также начинают проявлять толерогенные свойства.

Гораздо меньше известно про молекулярные механизмы развития толерантности. Известно, что ключевые события, определяющие судьбу трансплантата, решаются в момент презентации антигена. Основными участниками образования антигенных эпитопов для молекул главного комплекса гистосовместимости I класса являются иммунные протеасомы. При приживлении трансплантата протеасомы могут выполнять функции, не связанные с иммунным ответом. Иммунные протеасомы, содержащие субъединицу LMP2, вовлечены в борьбу с последствиями окислительного стресса, который часто является началом запуска процесса отторжения трансплантата.

Мы предполагаем, что развитие толерантности связано со сдвигом баланса между различными формами иммунных протеасом (содержащими субъединицу LMP2 и содержащими субъединицу LMP7), а также баланса между регуляторами активностей протеасом, 19S, служащим для деградации убиквитинилированных белков, и 11S, вовлеченным, в частности, в активацию иммунного ответа.

Работа поддержана РФФИ (гранты № 12-04-90914-мол_снг_нр и № 12-04-31621-мол-а).

ВВЕДЕНИЕ СИНТЕЗИРОВАННОЙ *IN VITRO* МОДИФИЦИРОВАННОЙ мРНК ГЕНА hTERT, ВЫЗЫВАЕТ КРАТКОВРЕМЕННУЮ ТЕЛОМЕРАЗНУЮ АКТИВНОСТЬ, В ФИБРОБЛАСТАХ КОЖИ ЧЕЛОВЕКА

© 2013 г. Р. Р. Файзуллин

Лаборатория проблем клеточной пролиферации

Технологии репрограммирования клеток человека без использования генетического модифицирования находят все большее применение в экспериментальной клеточной биологии. Одним из таких перспективных методов является введение синтезированной *in vitro* мРНК генов транскрипционных репрессирующих факторов (Yakubov et al., 2010; Warren et al., 2010). Данный подход исключает использование молекул ДНК при репрограммировании, что позволяет избежать риска генетического модифицирования, а также позволяет управлять экспрессией вводимого гена, т.к. время жизни введенной мРНК в клетке обычно составляет 24–48 ч. Использование модифицированных нуклеотидов (5-метилцитидин и псевдо-уридин) в

составе синтезированной мРНК, позволяет увеличить эффективность трансляции, за счет увеличения времени жизни введенной мРНК в клетке и уменьшения цитотоксического эффекта.

Каталитический компонент теломеразы (hTERT) является перспективным фактором репрограммирования клеток человека, учитывая функцию теломеразы по регулированию эпигенетического профиля субтеломерных областей генома (Mathew et al., 2010). Также hTERT может быть рассмотрен как потенциальный ген для генной терапии, ввиду достигнутых положительных результатов по увеличению средней продолжительности жизни мышей, при помощи генной терапии TERT (Bernardes de Jesus et al., 2012).

Целью данной исследования являлась разработка метода индукции управляемой теломеразной активности на основе введения синтезированной *in vitro* модифицированной мРНК гена hTERT. В данной работе нами была синтезирована модифицированная мРНК гена hTERT и было показано, что ее введение в фибробласты кожи человека

индуцирует кратковременную теломеразную активность. По нашему мнению, данный подход может быть использован в будущем для различных приложений в экспериментальной клеточной биологии, в том числе для безопасного увеличения пролиферативного потенциала культур клеток человека.

ДВУПОРОВЫЕ КАЛЬЦИЕВЫЕ КАНАЛЫ КИСЛЫХ ЭНДО/ЛИЗОСОМАЛЬНЫХ ВЕЗИКУЛ ПОДДЕРЖИВАЮТ СПОНТАННЫЙ РИТМ СОКРАЩЕНИЯ СЕРДЦА

© 2013 г. Е. С. Фёдорова

Лаборатория общей физиологии

Частота и сила сердечных сокращений определяется внешней нейроэндокринной регуляцией и спонтанной активностью пейсмэйкерных клеток самого сердца. Внутриклеточным мессенджером, активирующим сокращение кардиомиоцитов в ответ на нейроэндокринные факторы, является кальций. Ионы кальция поступают в цитоплазму мышечных клеток сердца из внешней среды через потенциалуправляемые каналы и из саркоплазматического ретикулума через рианодинчувствительные каналы и через каналы, активируемые инозитолтрифосфатом. В 2002 г. был открыт новый внутриклеточный источник ионов кальция — кислые эндо/лизосомальные везикулы (Churchill, Okada et al., 2002). Выброс Ca^{2+} из эндо/лизосомальных везикул осуществляется через особый тип каналов — двупоровые каналы (two-pore channels — TPC), открываемые NAADP (nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate) (Brailoiu, Churamani et al., 2009). Чувствительные к NAADP каналы TPC эволюционно консервативны и выявлены в трех биологических царствах (Lee, 2011), однако их физиологические функции практически не изучены.

Целью нашей работы было выяснение возможного участия активируемых NAADP кальциевых каналов эндо/лизосомальных везикул в регуляции

сократимости сердца. Для экспериментов было использовано изолированное сердце виноградной улитки *H. pomatia* как исключительно удобный объект, пригодный для длительной многочасовой регистрации сердечных сокращений в процессе разного рода воздействий. Мы показали, что проникающий через клеточные мембраны предшественник NAADP (NAADP-AM) в наномолярных концентрациях увеличивает частоту и амплитуду сокращений изолированного сердца виноградной улитки и обеспечивает его спонтанную сократительную активность. Блокатор рецепторов NAADP transNED-19 обратимо устраняет этот эффект и полностью подавляет спонтанную активность сердца. Аналогичное действие оказывает бафиломицин A1, ингибитор протонной АТФазы кислых эндо/лизосомальных везикул, вызывающий потерю этими органеллами ионов кальция. В отличие от спонтанных, индуцируемые серотонином сокращения сердца *H. pomatia* не блокируются при воздействии антагониста NAADP transNED-19. Проведенные исследования впервые продемонстрировали роль NAADP-зависимого выброса кальция через двупоровые каналы эндо/лизосомальных везикул как механизма, обеспечивающего спонтанную работу сердца.

СЕРОТОНИНЕРГИЧЕСКАЯ СИСТЕМА В РЕГУЛЯЦИИ РЕСНИЧНОЙ ЛОКОМОЦИИ ЮВЕНИЛЬНЫХ И ВЗРОСЛЫХ ОСОБЕЙ АРХИАННЕЛИД: СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ТЕПЛОВОДНОГО И ХОЛОДОВОДНОГО ВИДОВ

© 2013 г. Е. Г. Фофанова, Е. Е. Воронежская

Лаборатория сравнительной физиологии

У всех изученных на настоящий момент беспозвоночных животных серотонин (5-НТ) стимулирует биения ресничек, в какой бы области тела они не находились. Данная реакция наблюдается как у

взрослых форм, так и у личинок. Мы исследовали эффект аппликации низких доз 5-НТ на ресничную локомоцию ювенильных и взрослых особей архиааннелид, а также морфологию 5-НТ-ергиче-

ской нервной системы, вовлеченной в контроль локомоции, у двух близких видов: *Dinophilus gyrociliatus* (тепловодный) и *Dinophilus taeniatus* (холодноводный).

Представители обоих видов обладают сходным механизмом движения преимущественно за счет биения ресничек вентральной ресничной полоски и кольцевых ресничных шнуров, строение которых у *D. gyrociliatus* и *D. taeniatus* не имеет сильных различий. Однако топология 5-НТ-ергических элементов ноги и вентральных стволов у них принципиально различна. У *D. gyrociliatus* неравномерно распределенные тела нейронов и нейропилы располагаются непосредственно под вентральной ресничной полоской. У *D. taeniatus* тела нейронов расположены в передней трети туловища, вдоль вентральных нервных стволов. Отростки этих нейронов идут к ресничной полоске, где активно ветвятся.

Изменения в локомоции оценивали, измеряя длину пути, пройденного животным за определенный промежуток времени (треки). Добавление

5-НТ в морскую воду (10^{-12} – 10^{-6} М) вызывало концентрационно-зависимое удлинение треков у ювенильных особей обоих видов. Добавление тех же доз серотонина взрослым особям вызывало существенное укорочение треков, вплоть до полной остановки. Добавление агонистов 5-НТ рецепторов 1, 2 и 7 типов (5-СТ, 8-ОН-ДРАТ, α Met-НТ, каждый 10^{-12} – 10^{-7} М) также вызывало укорочение треков у взрослых особей архианнелид.

Таким образом, у двух близкородственных видов архианнелид 5-НТ-иннервация сходных локомоторных ресничных структур существенно различается. Ювенильные и взрослые особи реагируют на аппликацию 5-НТ противоположным образом. Дальнейший фармакологический анализ необходим для определения типа 5-НТ рецепторов, вовлеченных в процесс обнаруженной регуляции.

Работа поддержана грантами РФФИ № 12-04-01510, № 12-04-10119.

ВОЗМОЖНЫЙ МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ ПРЕНАТАЛЬНОГО ИНФИЦИРОВАНИЯ НА ГРГ-СИСТЕМУ

© 2013 г. В. С. Шарова

Лаборатория гистогенеза

В пренатальном онтогенезе воздействие бактериальной или вирусной инфекции на организм матери может оказывать влияние на развитие нейроэндокринной, в том числе репродуктивной системы плода. Ключевая роль в этом процессе принадлежит гонадотропин релизинг-гормон (ГРГ)-продуцирующей системе. Ранее нами было показано, что бактериальное инфицирование ЛПС *E. coli* на ранних сроках беременности подавляет миграцию ГРГ-нейронов из назальной мезенхимы в мозг и выход их предшественников в дифференцировку. Возможным механизмом регуляции интраназальной миграции ГРГ-нейронов является усиление синтеза цитокинов воспаления: интерлейкина (ИЛ)-6, лейкоингибирующего фактора (ЛИФ), белка хемотаксиса моноцитов (МСР)-1 и фактора некроза опухоли (ФНО α) сначала у матери, а затем в организме плода.

Целью данной работы явилось оценить уровень цитокинов воспаления во временной динамике после активации иммунной системы ЛПС в биологических жидкостях матери и плода и экспрессию рецепторов к этим цитокинам, влияющих на развитие ГРГ-нейронов. Содержание цитокинов измеряли с помощью ИФА и проточной цитометрии в сыворотке крови матери и плода, а также в

амниотической и цереброспинальной жидкостях плода через 1,5, 3, 6, 24 ч после внутрибрюшинного введения ЛПС (0,9 мкг/мышь) беременной самке. Для выявления рецепторов к цитокинам использовали двойное иммуногистохимическое мечение на ГРГ и рецепторы к ИЛ-6 и ЛИФ на сагиттальных срезах мозга у 12–13-дневных плодов мышей. Уровень цитокинов ИЛ-6, МСР-1, ФНО α и ЛИФ был значительно повышен в сыворотке крови матери и плода через 1,5 и 3 ч после введения ЛПС. Повышенный уровень этих цитокинов наблюдался в течение 6 часов после инъекции ЛПС в амниотической жидкости. Возрастание уровня цитокинов МСР-1, ИЛ-6 и ЛИФ наблюдалось также в цереброспинальной жидкости плода. Нами было обнаружено наличие рецепторов к ИЛ-6 в назальной области на вомероназальных и обонятельных нервах, по ходу которых также мигрируют ГРГ-нейроны. Кроме того, было показано наличие рецепторов к ЛИФ в назальной мезенхиме плода. Установлено также снижение репродуктивной функции у половозрелых особей, перенесших нарушение миграции ГРГ-нейронов в пренатальный период.

ВЫСОКИЙ УРОВЕНЬ ИЗМЕНЧИВОСТИ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО МАРКЕРА *CytB* (ГЕН ЦИТОХРОМ Б) У КОСМОПОЛИТИЧЕСКОГО “ВИДА” НАНОПУС (*NANNOPUS PALUSTRIS*)

© 2013 г. Д. М. Щепетов

Лаборатория экспериментальной эмбриологии

Попытки построения филогенетических реконструкций на основании анализа митохондриальных маркеров, особенно при использовании универсальных праймеров, часто приводят к ошибкам, связанным с существованием ядерных псевдогенов митохондриальных генов. Особенно выражено это правило при изучении групп животных, для которых полученная ложная филогения не противоречит явно ранее известным данным. При детальной проработке одного из случаев, где следовало бы подозревать невалидность полученных последовательностей, нами была обнаружена крайне любопытная картина. *Nannopus palustris* – мейобентосный вид копепод, распространенный по всему земному шару. Образцы из Северного, Черного и Белого морей, а также из Индийского океана и из Атлантического океана с побережья Северной Каролины (США), оказались морфологически и генетически полиморфны. При этом по ядерному маркеру 28S наблюдаются различия в 2–4%, в то время как по участку митохондриального гена *CytB* они достигают 66%. Логичным объясне-

нием наблюдаемого могла бы быть ошибочная амплификация ядерного псевдогена изучаемого митохондриального маркера. Однако все усилия по выявлению такой ошибки оказались тщетными. Сходные результаты получены разными исследователями в разных лабораториях. Рамка считывания в получаемых последовательностях не нарушена, и значительная часть замен находится в третьей позиции кодона. При этом предсказанная последовательность белка имеет все домены, характерные для выбранного участка. Филогенетическая реконструкция на основе предсказанных белковых последовательностей всех копепод (для которых имеются данные) группирует вместе все известные образцы наннопусов. Немногие известные последовательности митохондриального гена *COI*, также необычайно далеки друг от друга, что подтверждает необходимость искать причины вероятно высокой наблюдаемой изменчивости Цитохрома Б и всего митохондриального генома в образе жизни или особенностях функционирования митохондрий в роде *Nannopus*.

УДК 597.828:591.471.32

ИНДИВИДУАЛЬНАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ РАЗВИТИЯ СЕРОЙ ЖАБЫ *BUFO BUFO* (ANURA, BUFONIDAE). 1. СРОКИ РАЗВИТИЯ И ОТКЛОНЕНИЯ ВО ВНЕШНЕМ СТРОЕНИИ

© 2013 г. Е. Е. Коваленко*, Ю. И. Кружкова**

*С.-Петербургский государственный университет
199034 С.-Петербург, Университетская наб., д. 7/9

**Российский государственный педагогический университет им. А.И. Герцена
191186 С.-Петербург, набережная реки Мойки, д. 48

E-mail: kovalenko_i@mail.ru

Поступила в редакцию 05.07.12 г.

Окончательный вариант получен 27.12.12 г.

Проведен анализ параметров развития всех потомков одной пары производителей серой жабы, полученных за одно спаривание в лабораторных условиях (при сведении к минимуму естественной элиминации). Всего исследовано 1633 экз. Приведенные фактические данные показывают, что диапазон возможностей вида по основным параметрам развития намного шире, чем это показывают данные стандартных таблиц развития. Описаны “фоновые аномалии” внешнего строения (Коваленко, 2003) и даны их возможные частоты в условиях, максимально приближенных к оптимальным.

Ключевые слова: *Bufo bufo*, лабораторное выращивание, параметры развития, изменчивость.

DOI: 10.7868/S0475145013040046

Понятие “нормальное развитие” объекта в сознании биологов прочно связано с понятием “оптимальные условия” развития для конкретного вида. То есть предполагается, что существует относительно узкий диапазон условий, в которых данный вид способен дать норму развития, и, соответственно, норму дефинитивного строения. Параметры строения и темпов развития данного вида устанавливаются эмпирически по принципу “что демонстрирует большинство” особей, а параметры “оптимальных” условий — по принципу “в каких условиях мы наблюдаем” это большинство (дружное развитие, высокий % нормального строения и др.). Казалось бы, эта задача была уже неоднократно решена при лабораторном разведении, во всяком случае, на модельных объектах (Nieuwkoop, Faber, 1956; Gosner, 1960; Дабагян, Слепцова, 1975 и т.д.). Но важно, для каких целей проводились такие исследования, т.к. от этого зависели поставленные задачи, а, следовательно, и полученный результат.

Так для установления параметров типичного (наиболее вероятного) развития модельного объекта с высокой плодовитостью, достаточно взять небольшую выборку из числа потомков, произведенных одной парой. Например, для модельных

видов бесхвостых амфибий, обычно отличающихся высокой плодовитостью (до 1.5–2 тыс. потомков), это будет небольшая группа головастика (100–300 особей). Достаточно, чтобы эта группа дружно проходила основные этапы развития — с показателями, которые демонстрировало бы большинство потомков (средние показатели). Такую группу легко отобрать на стадии вылупления из яиц, на стадии появления почки задней конечности и на других значимых для Anura вехах онтогенеза, в том числе, на стадии начала и завершения метаморфоза. Если задача состоит в выявлении только типичных параметров развития, то, естественно, единичные отклонения от них на каждом этапе просто отбрасываются. В результате анализу подвергается выборка, значительно меньшая, чем плодовитость данной пары производителей (в анализ берется только часть произведенных потомков, а из них — только те, что показывают “типичные” признаки строения и развития).

Конечно, таблицы нормального развития строятся на основании данных, полученных на потомстве не одной пары производителей данного вида. Однако, если выборка из потомства каждой пары составляется по тому же принципу, то и результат будет выглядеть одинаково — как наиболее вероят-

ная для вида схема развития, что, собственно, и отвечает первоначально поставленным задачам.

Однако нередко этой схеме начинают приписывать большее значение, чем она действительно значит (наиболее вероятный сценарий), а именно — ее воспринимают как нормальный сценарий в значении “правильный”. А от представления о “правильном” ходе онтогенеза до представления о “единственно правильном” — остается всего один шаг. Но и этим шагом часто пренебрегают, легко совмещая эти понятия (см. Коваленко, 2003). Это, казалось бы, очевидное заблуждение, приводит к целому ряду неизбежных, но ложных заключений.

Среди них главное — убеждение в том, что онтогенез конкретного вида строго предопределен, а все отклонения от него есть результат случайных помех развитию. В конечном итоге варианты индивидуальной изменчивости выглядят не только как случайный продукт развития, но как ошибочный (порочный) результат, которого в принципе быть не должно. А поскольку абсолютное число каждого такого варианта в *намеренно созданных небольших* выборках очень мало, то и значимость их для эволюции либо подвергается серьезному сомнению, либо вовсе не учитывается. Более того, каждый из них обычно априори рассматривается, как нежизнеспособный (или неконкурентоспособный) вариант (Балахонов, 1990; Корольков, Петленко, 1977).

Эти теоретические представления настолько укрепились в сознании, что им не мешают даже очевидные факты, с которыми постоянно сталкиваются исследователи. Хорошим примером являются так называемые “таблицы нормального развития” (см., например, Объекты биологии развития, 1975). В них каждая стадия характеризуется нормой морфологических и функциональных признаков, а также нормальными сроками развития. Создан эталон для сравнения, что очень удобно и им широко пользуются (судя по индексу цитирования). Но всякий, кто определял стадии развития у реальных объектов по этим таблицам, знает, что соответствие всех параметров установленному стандарту встречается крайне редко. Так, головастики одного вида, имеющие одинаковый личный возраст, могут демонстрировать очень разную степень развития и быть при этом одинаково жизнеспособными. Например, головастики, одновременно достигшие стадии “почки задней конечности”, могут показывать разную степень развития осевого скелета или других органов (Коваленко, 1985). Удивительно, но это не мешает устанавливать стадии развития объектов, поскольку исследователь интуитивно ориентируется на соответствие большинства признаков, игнорируя не

соответствие некоторых. Например, сроки развития головастика могут превышать установленную норму в несколько раз и, тем не менее, приводить к типичному строению и не нарушать функционирования (Коваленко, Данилевская, 1991) что позволяет определять их как нормальных. Одновременно, личинки, развивавшиеся примерно теми темпами, которые заданы в “таблицах”, могут иметь более или менее серьезные отклонения в строении, и даже пороки развития. При этом последние далеко не всегда приводят к летальному исходу (Коваленко, 2000а) и сразу возникает вопрос, считать ли их носителей нормальными, если они способны поддерживать целостность и функционирование, или выносить их за рамки нормы?

Целью данного исследования было: установить диапазон временных параметров развития, а также диапазон индивидуальной изменчивости признаков внешнего строения и признаков осевого скелета у всех потомков одной пары производителей, полученных от одного спаривания и выращенных в лаборатории в одинаковых условиях.

Для этого были поставлены следующие задачи:

- 1) использовать один из видов бесхвостых амфибий, отличающийся высокой плодовитостью и хорошо изученный на строение осевого скелета;
- 2) производителей взять из природной популяции в сезон размножения в стадии амplexуса;
- 3) получить максимально возможное число оплодотворенной икры от одной пары производителей (от одного спаривания);
- 4) вырастить всех полученных головастика в одинаковых условиях, рекомендованных для этого вида (в лаборатории), до стадии завершения метаморфоза; то есть снять все возможные факторы естественной в природе элиминации на личиночных стадиях развития;
- 5) провести анализ параметров развития группы (смертность, сроки вылупления, сроки начала и конца метаморфоза) и оценить их разброс;
- 6) провести анализ всех полученных потомков на внешнее строение и строение посткраниального скелета, в том числе и тех, что погибли во время развития;
- 7) при суммировании всех данных оценить развитие группы по критерию “развитие с эффектом нормы признаков” (Коваленко, 2003).

В качестве модельного объекта был выбран один из хорошо изученных видов бесхвостых амфибий — серая жаба *Bufo bufo* (сем. Bufonidae). Этот выбор был определен еще и тем, что ранее нами был проведен анализ разнообразия нормальных вариантов строения осевого скелета, встречаю-

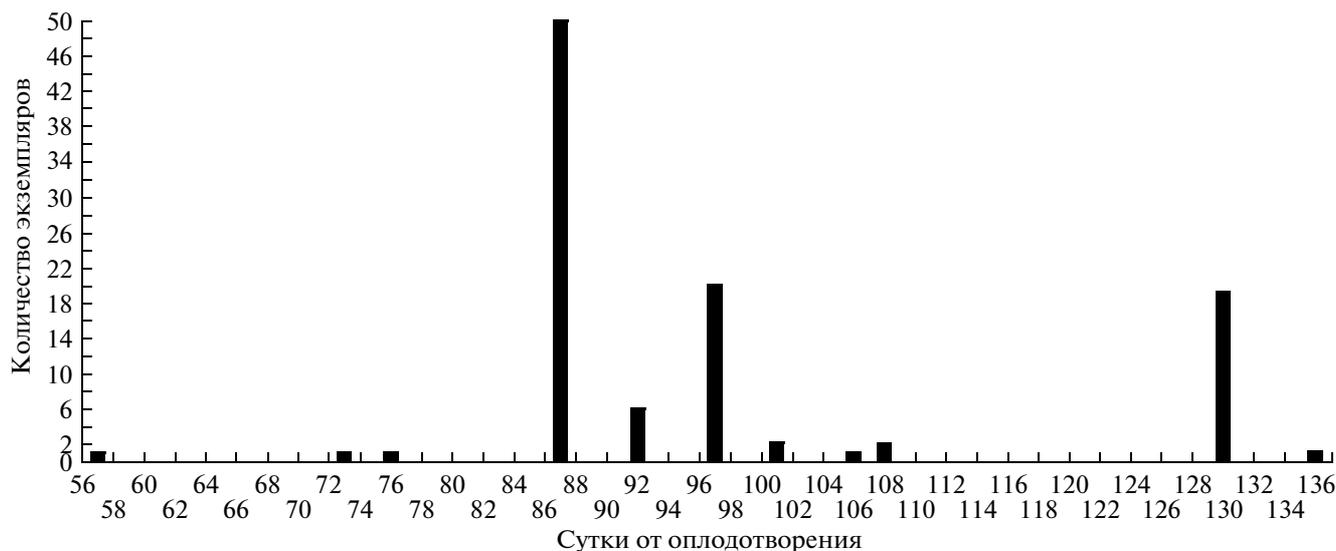


Рис. 1. Смертность личинок в серии лабораторного выращивания *Bufo bufo*.

шихся в этом семействе (Коваленко, Данилов, 2006а, б).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В разгар сезона размножения, 15 мая 1996 года, была взята пара производителей *Bufo bufo* из природной популяции в окрестностях г. Санкт-Петербурга (поселок Толмачево). Пара была изъята в состоянии амplexуса и примерно через 3 часа доставлена в лабораторию. В лаборатории она была помещена в аквариум с отстоянной водопроводной водой. За время перемещения производителей амplexус не был прерван. Примерно через 12 часов после доставки в лабораторию пара приступила к икрометанию.

После откладки яиц, икра была помещена в несколько емкостей с водой с учетом оптимальной плотности будущих личинок (см. Коваленко, Данилевская, 1991). Всего было организовано 5 кювет с разным объемом воды, в которых содержалось от 180 до 1142 личинок (в зависимости от объема воды). Условия для развития личинок создавались в лаборатории по стандартной методике, разработанной для травяной лягушки *Rana temporaria* (Дабагян, Слепцова, 1975).

Весь полученный материал (умершие до завершения метаморфоза и закончившие метаморфоз личинки) фиксировался в 4% формальдегиде. В дальнейшем из него изготавливались тотальные препараты, дифференцированно окрашенные на хрящ и кость, и просветленные в глицерине (Wassersug, 1976). Всего исследовано 1633 экземпляра.

РЕЗУЛЬТАТЫ

1. Плодовитость, успех оплодотворения и смертность личинок в группе

Визуальный подсчет после икрометания показал, что пара серых жаб отложила примерно 2000 яиц. Такой показатель можно рассматривать как нормальный для данного вида (см. Дунаев, 1999).

Вылупление головастиков в разных кюветах началось практически одновременно и продолжалось в течение суток. Всего вылупилось 1900 личинок.

Зафиксировать смертность на самых ранних стадиях развития в больших группах личинок очень трудно (их тела очень быстро разлагаются, а также быстро утилизируются другими личинками). Но смертность на ранних стадиях развития можно примерно оценить по косвенным данным. Так, при наблюдении за развитием данной группы зафиксированы тела 1684 личинки (в том числе 104 экз., найденных мертвыми). Следовательно, около 120 инициированных к развитию особей (примерно 6%) погибли на самых ранних стадиях развития (вскоре после вылупления).

Тела погибших во время развития личинок мы начали регистрировать на 57 сутки развития (начиная от оплодотворения). Общая смертность до начала метаморфоза составила 166 экз. — 8.7% от общего числа вылупившихся личинок. Во время метаморфоза погибло 57 особей (3%). При этом максимальный показатель смертности в конкретный момент этого периода (50 экз., 2.6%) зарегистрирован на 87 сутки развития (рис. 1). На этих

стадиях онтогенеза бесхвостых амфибий нередко регистрируется повышенная смертность (Duellman, Trueb, 1986). Еще один пик смертности (19 экз., 1%) отмечен на 130 сутки развития. Он не показывает прямой связи со стадиями прохождения метаморфоза, а также не связан с какими-либо изменениями в условиях содержания личинок.

В целом показатель смертности за все время развития группы от вылупления до завершения метаморфоза составил 11.7% (223 экз.). Это очень низкий уровень смертности, что говорит о том, что условия развития группы не выходили из диапазона оптимальных для вида условий.

2. Характер развития группы и общие сроки развития

Одним из показателей нормального развития группы сибсов является то, что они дружно проходят определенные стадии онтогенеза. Известно, что в намеренно созданных экстремальных условиях в лаборатории (Коваленко, Данилевская, 1991), а также в экстремальных условиях в природе — например, в быстро пересыхающих временных водоемах, или в сильно затененных лесных водоемах и пр. (Коваленко, 1992), развитие головастики группы может носить принципиально другой характер. Сибсы распадаются на несколько групп, резко различающихся темпами онтогенеза, так что их окончательное развитие существенно различается и сроками, и результатами (Коваленко, 2000а). Но в данной серии не отмечено никаких признаков аномального характера развития группы. Это позволяет констатировать, что существенных отклонений в основных параметрах условий развития не было.

Известно, что личиночное развитие бесхвостых амфибий делят на два принципиально разных периода — до метаморфоза и сам метаморфоз. В период метаморфоза происходит переход от водной организации к наземной организации (Duellman, Trueb, 1986), независимо от того, какой образ жизни в дальнейшем будет вести дефинитивная особь. Смена личиночных черт строения на черты наземной стадии происходит в относительно короткий период, сопровождается принципиальными физиологическими перестройками организма и характеризуется повышенной смертностью (см. выше).

В данной лабораторной серии серой жабы минимальный срок развития до состояния наземной формы (постметаморфозная стадия) составил 66 суток, а максимальный — 162 суток. Поскольку вылупление личинок было дружным (в течение 1 суток), то следует констатировать, что общая

длительность развития личинок до конца метаморфоза в одинаковых условиях может различаться почти в 2.5.

Несмотря на то, что общие сроки развития группы существенно превышают предполагаемые “оптимальные” для этого вида сроки (50–65 дней), группа развивалась без существенных отклонений, как по общему характеру развития, так и по результатам окончательного строения (см. вторую часть данного сообщения).

3. Сроки метаморфоза

Самый ранний срок начала метаморфоза отмечен на 63 сутки (рис. 2; 9 личинок, 0.5%), самый поздний — на 153 сутки (3 личинки, 0.2%).

На диаграмме как будто бы видны два пика, когда начало метаморфоза отмечено сразу у относительно большого числа личинок: 1) на 77 сутки (169 экз., 8.89%); 2) на 97 сутки (142 экз., 7.47%). Однако, во-первых, временные границы пиков определить довольно трудно (особенно второго из них). А, во-вторых, объем обеих групп лишь относительно велик — он составляет весьма скромную долю от общего числа личинок приступавших к метаморфозу.

Остальные личинки (1322 экз., 69.58%) приступали к метаморфозу в разное время и разными по объему партиями (0.05–6.11%). В результате четко очертить временной интервал, который можно было бы считать нормой начала превращения для данного вида довольно трудно, если исходить из представления, что норма — это большинство. Во всяком случае, этот интервал намного больше, чем тот, который можно вычислить, наблюдая за развитием небольшой и специально отобранной выборки. Добавим, что хотя диаграмма (рис. 2) показывает в целом нормальное распределение, ее левая часть заметно растянута по оси времени. Это связано с тем, что партий, относительно рано приступающих к метаморфозу, значительно меньше, чем партий, поздно начинающих превращение. При этом, в последней трети общего срока развития группы, партии, одновременно начинающих метаморфоз личинок, становятся все меньше по объему.

Самый ранний срок завершения метаморфоза отмечен на 66 сутки (рис. 3; 5 экз., 0.26%), самый поздний — на 162 сутки (3 экз., 0.16%). Общая картина темпов завершения метаморфоза совпадает с таковой начала превращения. Отмечены два условных пика, когда метаморфоз завершает сразу относительно большое число личинок: 1) 78–80 сутки (210 экз., 11.05%); 2) 94–100 суток (423 экз., 22.26%).

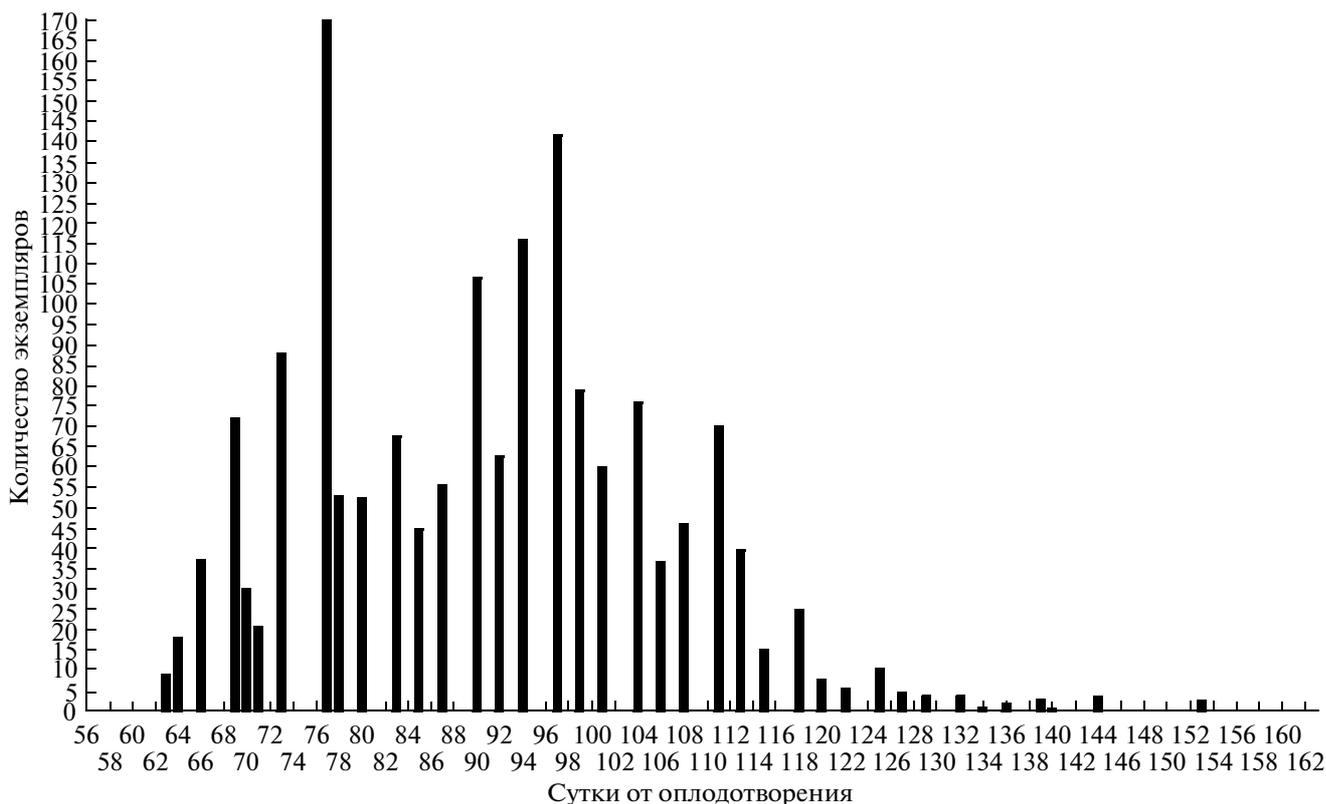


Рис. 2. Динамика начала метаморфоза в серии лабораторного выращивания *Bufo bufo*.

Остальные личинки (823 экз., 43.32%) заканчивали метаморфоз в разное время небольшими партиями (0.05–4%). Диаграмма завершения метаморфоза показывает такую же картину, как и диаграмма его начала (рис. 3): 1) партий, относительно рано заканчивающих метаморфоз, значительно меньше, чем партий, поздно завершающих превращение; 2) партии личинок, завершивших метаморфоз, по мере приближения к концу общего срока развития становятся все меньше по объему.

Темпы прохождения самих стадий метаморфоза разными партиями личинок были примерно одинаковыми (или несущественно различались). Иными словами длительность самого метаморфоза не показывает прямой связи со сроками его начала.

4. Результаты развития (строение)

Основным показателем развития считают его результаты, т.е. конечное строение особи. А именно: ее соответствие или несоответствие установленной норме строения. Но если речь идет о соответствии норме строения целой группы особей (тем более большей группы), то вопрос решается

не так легко, как могло бы показаться. Так, ранее (Коваленко, 2000а, б) было предложено различать фоновые и массовые аномалии, т.к. проявление их различается не только по частоте встречаемости, но и по ряду других показателей.

Фоновые аномалии – варианты состояния признака (признаков), отличные от нормы, но постоянно проявляющиеся на ее фоне, даже в оптимальных условиях развития. Частоты встречаемости каждого из них настолько малы по сравнению с нормой признака, что не требуется никаких специальных статистических методов для их определения (их частоты составляет единицы, а чаще десятые или даже сотые доли %).

Массовые аномалии – проявляются в результате резкого снижения частоты реализации нормы отдельных признаков (эффект “падения нормы”). При этом бывшая “норма” замещается не одним, а множеством вариантов каждого из признаков (Коваленко, 2003). Аномальные варианты признаков образуют между собой новые для вида комбинации и, в результате, число вариантов строения структуры резко возрастает (проявляется поливариантность).

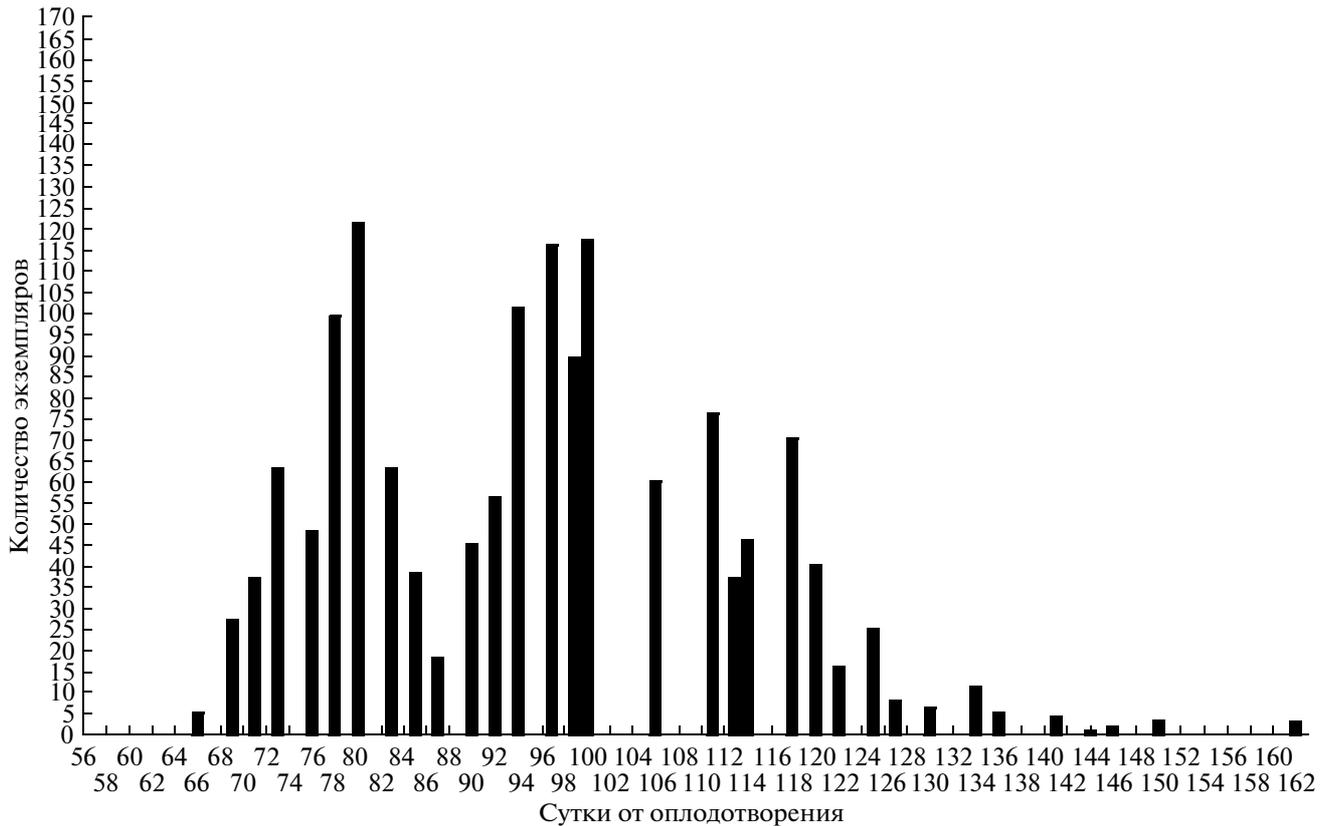


Рис. 3. Динамика окончания метаморфоза в серии лабораторного выращивания *Bufo bufo*.

В данной группе потомков серой жабы отмечены только фоновые аномалии (как внешнего, так и внутреннего строения). Иными словами, и по этому показателю развитие группы можно считать нормальным (соответствующим наиболее вероятному пути онтогенеза).

5. Аномалии внешнего строения¹

Отклонения от нормы во внешнем строении регистрировались по следующим показателям: наличие всех частей тела, самые общие пропорции тела в целом и его отдельных частей.

Строение близкое к норме показали 1616 особей (99%), соответственно, все особи с аномалиями внешнего строения составили всего 1%. Встречены следующие отклонения:

- а) аномалия развития головного отдела – 1 экз. (0.06%);
- б) явное нарушение строения парных конечностей – 8 экз. (0.49%);
- в) искривление и/или укорочение туловища – 8 экз. (0.49%).

¹ В данном разделе статьи доля аномальных особей высчитывается от общего числа исследованных экземпляров (1633 экз.).

Аномалия головного отдела выражалась в непропорциональном развитии черепа. Один глаз был переразвит, а второй – фактически отсутствовал. Переразвитый глаз занимал латеральное положение, в отличие от известных вариантов циклопии, при которой формируется одна глазница, расположенная в середине лицевой части (см. Балахонов, 1990). Обычно при циклопии отсутствует или существенно недоразвивается носовой отдел черепа. У данного экземпляра (коллекционный № 341) носовой отдел черепа развит, хотя общие пропорции черепа нарушены. Циклопия у разных позвоночных животных связана с существенным пороком развития головного мозга. Большинство циклопов нежизнеспособны и погибают на ранних стадиях развития. В нашем случае личинка вполне успешно прошла развитие до последних стадий метаморфоза и была прижизненно зафиксирована для дальнейшего исследования. Различные варианты одноглазия хорошо известны у самых разных позвоночных животных, хотя и являются одними из самых редких по частоте среди пороков развития.

Нарушение строения парных конечностей у бесхвостых амфибий часто описываются в литературе (см. обзоры Dubois, 1979; Коваленко, 2000б)

как в составе фоновой изменчивости, так и при массовом характере их проявления. Но при анализе данных из природных популяций, определить границу между этими явлениями по частоте встречаемости не так просто. И это понятно — трудно определить, каково общее число произведенных на свет потомков, а уж тем более, каково число потомков от каждой пары производителей (о методических трудностях см. у Коваленко, 2000б). По нашим данным, полученным в лабораторных условиях, при массовом проявлении аномалий конечностей и их поясов (без специальных воздействий на ход развития) доля аномальных особей может достигать 85–100% (Коваленко, Данилевская, 1991; Коваленко, Кружкова, 2000). В составе фоновой изменчивости аномалии конечностей (и их поясов) встречаются крайне редко и зарегистрировать их можно только в большой группе потомков, полученных от одной пары и доведенных до стадий метаморфоза (Kovalenko, Danilevskaya, 1994; Коваленко, 2000а). Согласно данным, ранее полученным при выращивании травяной лягушки (*Rana temporaria*, Kovalenko, Danilevskaya, 1994), шпорцевой лягушки (*Xenopus laevis*, Kovalenko, 1995), серой жабы (*Bufo bufo*, Kovalenko E., Kovalenko S., 1996) мы предполагали, что такие аномалии у бесхвостых амфибий должны составлять не более десятых, а, скорее всего, даже сотых долей процента. Данные по серой жабе подтвердили это предположение.

Аномалии конечностей (и их поясов), отмеченные в исследованной серии серой жабы, можно с полной уверенностью отнести к группе “фоновая изменчивость”. Всего отмечено 8 экз. (0.49%). Из них аномалии обеих задних конечностей описано у 5 экз., аномалия только передних конечностей — у 2 экз., аномалии и передних и задних конечностей — у 1 экз.

Искривление и/или укорочение туловища. Эта аномалия зарегистрирована у 8 экз. (0.49%).

Если речь идет об описании животного с ярко выраженной продольной осью двусторонней симметрии, то полагаем, что нет необходимости специально определять, что такое “искривление” его туловищного отдела. Отметим только, что изгибы тела могут быть ориентированы не только латерально, но и дорсо-вентрально. Несколько труднее дать ориентир для определения, что туловищный отдел “укорочен”, хотя такого рода диспропорция хорошо видна внешне.

Незначительное искривление тела, при котором длина туловищного отдела практически соответствует нормальным пропорциям, отмечено у 4 экз. (0.25%). Совпадение искривления и укорочения

туловищного отдела встречено у 3 экз. (0.18%). Все они демонстрируют синдром НС (нарушение сегментации) и синдром НА (нарастающей асимметрии в расположении зачатков позвонков) (Коваленко, 1983, 1992). Подробнее об этих аномалиях внутреннего строения будет рассказано во второй части данной статьи. Только у одной особи (0.06%) была отмечена диспропорция отделов тела (явное укорочение туловищного отдела), при котором не отмечено никаких существенных нарушений в строении осевого скелета.

ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно поставленным задачам (в частности, задаче № 7) можно с уверенностью констатировать, что развитие группы потомков одной пары производителей в лабораторных условиях прошло с “эффектом нормы признаков” (Коваленко, 2003). Это означает, что каждый из учтенных признаков внешнего и внутреннего строения продемонстрировал ярко выраженную норму (см. вторую часть данного сообщения). Основные показатели развития группы также подтверждают такое заключение. Это — успешность оплодотворения, низкая смертность на ранних этапах развития и в течение всего личиночного развития. А также то, что группа не распалась на несколько подгрупп, резко различающихся темпами онтогенеза, часть из которых показывала бы долгие остановки развития на одной из стадий, и явно ускоренные темпы на следующих этапах. Иными словами, группа не показывала тех признаков, которые свойственны развитию личинок бесхвостых амфибий, развивающихся в явно экстремальных условиях (Коваленко, 2000а).

Это дает нам право на этом примере обсуждать минимум два аспекта онтогенеза:

1) насколько канализирован этот процесс у конкретного вида в примерно одинаковых и постоянных лабораторных условиях;

2) и почему в гораздо более широком диапазоне условий в природных популяциях вид продолжает производить норму?

По первому пункту приведенные здесь данные, на наш взгляд, говорят вполне определенно. Диапазон возможностей вида по основным параметрам развития намного шире, чем это представляется по данным, вычисленным на основании наблюдения за развитием небольшой (репрезентативной) выборки. Об этом говорят и общие сроки развития (общая длительность развития личинок до конца метаморфоза в одинаковых условиях может различаться в 2.5–3 раза), и сроки достижения

определенных стадий развития (например, начала и конца метаморфоза).

Так, время достижения начала метаморфоза варьирует от 63 суток до 153 суток (от дня оплодотворения). То есть возможности достижения этой стадии различаются почти в 2.5 раза, не смотря на то, что в пределах этого интервала можно выделить два пика численности приступающих к метаморфозу (рис. 2). Но они охватывают меньшую часть группы. Большая часть личинок (1322 экз., 69.58%, см. выше) выпадает из этого правила. И более того, не демонстрирует никакого правила — они приступали к метаморфозу в разное время и разными по объему партиями (0.05–6.11%).

Общая картина завершения метаморфоза совпадает с таковой начала превращения. Срок завершения превращения варьирует от 66 суток до 162 суток (от дня оплодотворения). То есть длительность развития может различаться так же почти в 2.5 раза. И так же отмечены два пика численности — 210 экз. на 78–80 сутки и 423 экз. на 94–100 сутки. И точно также большая часть личинок (823 экз., 43.32%) заканчивали метаморфоз в разное время небольшими партиями (0.05–4%).

Это и есть фактические данные, подтверждающие тезис, выдвинутый выше — диапазон возможностей вида по основным параметрам развития намного шире, чем это показывают данные стандартных таблиц развития.

На второй вопрос, поставленный в начале Обсуждения дать ответ намного сложнее. Почему в гораздо более широком диапазоне условий в природных популяциях вид продолжает производить норму, если даже в оптимальных условиях он показывает такой диапазон возможностей? Приведенные здесь данные о частоте аномалий внешнего строения показывают, что частота вариантов индивидуальной изменчивости слишком мала, чтобы серьезно ограничивать потенцию вида для воспроизведения нормы.

Для ответа на этот вопрос нам не хватает данных об отклонениях во внутреннем строении. Может быть, именно они отсекают те варианты, которые выходят за рамки предполагаемого диапазона нормального развития? Анализ аномалий осевого скелета у данного вида дан во второй части статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Балахонов А.В. Ошибки развития. Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1990. 278 с.
- Дабаян Н.В., Слепцова Л.А. Травяная лягушка *Rana temporaria* L. в сб.: Детлаф Т.А. (ред.). Объекты биологии развития. М.: Наука, 1975. С. 442–462.
- Дунаев Е.А. Разнообразие земноводных (по материалам экспозиции Зоол. музея МГУ). Разнообразие животных. М.: Изд-во МГУ, 1999. С. 101–108.
- Коваленко Е.Е. Коррелятивные изменения в позвоночнике травяной лягушки *Rana temporaria* // Зоол. Журн. 1983. Т. 62. Вып. 4. С. 564–569.
- Коваленко Е.Е. Строение, развитие и изменчивость позвоночника травяной лягушки (*Rana temporaria* L.): Автореф. канд. дис. Л., 1985. С. 1–16.
- Коваленко Е.Е. Аномалии позвоночника бесхвостых амфибий СПб.: Изд-во СПб. ун-та, 1992. 142 с.
- Коваленко Е.Е. Изменчивость посткраниального скелета бесхвостых амфибий: Автореф. дис. докт. биол. наук. СПб.: ЗАО “Познание”, 2000а. 117 с.
- Коваленко Е.Е. Массовые аномалии конечностей у бесхвостых амфибий // Журн. общ. биол. 2000б. Т. 61. № 4. С. 412–427.
- Коваленко Е.Е. Эффект нормы признака и его теоретическое значение // Эволюционная биология: история и теория. 2003. Вып. 2. С. 66–87.
- Коваленко Е.Е., Данилевская С.Э. Экспериментальное получение аномалий позвоночника у бесхвостых амфибий. 1. Развитие личинок. 2. Аномалии позвоночника // Вестн. Ленингр. ун-та. 1991. Вып. 2. № 1. С. 11–23.
- Коваленко Е.Е., Данилов И.Г. Разнообразие крестцово-уростильного отдела в семействе Bufonidae (Amphibia, Anura). 1. Фактическое разнообразие крестца у буфонид // Зоол. Журн. 2006а. Т. 85. № 4. С. 500–516.
- Коваленко Е.Е., Данилов И.Г. Разнообразие крестцово-уростильного отдела в семействе Bufonidae (Amphibia, Anura). 2. Анализ разнообразия методом спектров // Зоол. Журн. 2006б. Т. 85. № 6. С. 725–740.
- Коваленко Е.Е., Кружкова Ю.И. Аномалии задних конечностей у лабораторной шпорцевой лягушки *Xenopus laevis* (Anura, Pipidae). 1. Феномен массовых аномалий // Вестн. СПбГУ. 2000. Сер. 3. Вып. 1. № 3. С. 3–21.
- Корольков А.А., Петленко В.П. Философские проблемы теории нормы в биологии и медицине. М.: Медицина, 1977. 391 с.
- Объекты биологии развития. М.: Наука, 1975. 582 с.
- Dubois A. Anomalies and mutations in natural populations of the *Rana “esculenta”* complex (Amphibia, Anura) // Mitt. Zool. Mus. Berlin. 1979. Bd. 55. H. 1. P. 59–87.
- Duellman W.E., Trueb L. Biology of amphibians. N.-Y.: McGraw-Hill, 1986. 670 p.
- Gosner K.L. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification // Herpetologica. 1960. V. 16. P. 183–190.
- Kovalenko E.E. On some sacral anomalies in laboratorial common plattana *Xenopus laevis* (Anura, Pipidae) // Rus. J. Herpetol. 1995. V. 2. № 2. P. 170–173.
- Kovalenko E.E., Danilevskaya S.E. On unique forms of anomalous sacral structure in tailless amphibians // Rus. J. Herpetol. 1994. V. 1. № 1. P. 30–36.

- Kovalenko E.E., Kovalenko Ju.I.* Certain pelvic and sacral anomalies in Anura // Russ. J. Herpetol. 1996. V. 3. № 2. P. 172–177.
- Nieuwkoop P.D., Faber J.* Normal table of *Xenopus laevis* (Daudin). A systematical and chronological survey of the development from the fertilized egg till the end of metamorphosis. Amsterdam: North-Holland Publ. Co., 1956. 243 p.
- Wassersug R.J.A.* Procedure for differential staining of cartilage and bone in whole formalin-fixed vertebrates // Stain Techn. 1976. V. 51. № 2. P. 131–134.

Individual Variation in the Development of the Common Toad, *Bufo bufo* (Anura, Bufonidae): 1. Timing of Development and Anomalies of External Structure

E. E. Kovalenko^a and Yu. I. Kruzhkova^b

^aSt. Petersburg State University, Universitetskaya nab. 7/9, St. Petersburg, 199034 Russia

^bHerzen State Pedagogical University, nab. reki Moiki 48, St. Petersburg, 191186 Russia

e-mail: kovalenko_j@mail.ru

Abstract—Parameters of development have been analyzed in all offspring (1633 ind.) from the same spawn of one pair of common toads under conditions of laboratory rearing, with natural elimination being reduced to a minimum. The results show that the range of developmental options for the species is much wider than it follows from the standard tables of development. “Background anomalies” (Kovalenko, 2003) in the external structure of developing larvae are described and their probable frequencies under nearly optimal conditions are indicated.

Keywords: *Bufo bufo*, laboratory rearing, parameters of development, variation.

УДК 597.828:591.471.32

ИНДИВИДУАЛЬНАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ РАЗВИТИЯ СЕРОЙ ЖАБЫ *BUFO BUFO* (ANURA, BUFONIDAE). 2. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ПРИЗНАКИ ОСЕВОГО СКЕЛЕТА

© 2013 г. Е. Е. Коваленко*, Ю. И. Кружкова**

*С.-Петербургский государственный университет
199034 С.-Петербург, Университетская наб., д. 7/9

**Российский государственный педагогический университет им. А.И. Герцена
191186 С.-Петербург, набережная реки Мойки, д. 48

E-mail: kovalenko_i@mail.ru

Поступила в редакцию 05.07.12 г.

Окончательный вариант получен 27.12.12 г.

Проведен анализ индивидуальной изменчивости диагностических признаков осевого скелета у всех потомков одной пары производителей серой жабы, выращенных в лабораторных условиях (при максимальном снижении естественной элиминации). Всего исследовано 1633 экземпляра; зарегистрировано более 50 аномалий скелета. Приведены фактические данные по частоте отклонений “фоновых аномалий” (Коваленко, 2003) от нормы у данного вида. Рассмотрены коррелятивные отношения между проявлением отдельных вариантов состояний признаков. Обсуждается проблема соотношения нормы и аномалий в индивидуальной изменчивости.

Ключевые слова: *Bufo bufo*, посткраниальный скелет, индивидуальная изменчивость, “фоновые аномалии”, диагностические признаки.

DOI: 10.7868/S0475145013040058

Проблема соотношения нормы и аномалий (индивидуальной изменчивости) стоит перед исследователями многих направлений биологии (систематика, палеонтология, экспериментальные исследования развития в оптимальных или намеренно экстремальных условиях и мн. др.). В любом случае для анализа собственных данных исследователю необходима какая-то точка отсчета, относительно которой можно оценить строение интересующего его объекта. В отношении нормы такие модели, казалось бы, созданы и создаются. Это типовые описания нормального дефинитивного строения таксонов, а также описания изменений строения в ходе онтогенеза для модельных объектов (например, таблицы нормального развития). Но в отношении отклонений от нормы исследователи вынуждены пользоваться разрозненными данными, опираясь в основном на единичные описания аномалий, встреченных у разных видов при разных обстоятельствах (в природной популяции, при лабораторном выращивании, в результате намеренного вмешательства в ход онтогенеза и т.п.). Такая фрагментарная информация обычно не позволяет сделать даже элементарные обобщения. Например, насколько тот или иной вариант аномального строения типичен для данного таксо-

на и только ли для него, какова вероятность его встречаемости, с какими другими аномальными вариантами строения он обычно коррелирует и др. Опираясь на не полную информацию, исследователи нередко приходят к необоснованным выводам.

Так, не зная о том, что ряд аномалий строения проявляются совместно, т.е. представляют собой один синдром, автор, описывая их по отдельности, невольно множит абсолютное число отклонений и приходит к выводу о высоком уровне аномалий (Pugener, Maglia, 2009; Неустроева, 2012). Не зная о том, какие варианты изменчивости типичны для данного вида (или близких к нему видов) и с какой частотой они у него проявляются даже при оптимальных условиях развития, можно легко придти к заключению о том, что развитие проходило в экстремальных условиях только на основании абсолютного числа обнаруженных аномалий (Вершинин, 1985, 1989). Нередко такое преувеличенное представление об уровне аномалий у данного вида побуждает исследователя к слишком далеко идущим выводам, например, о том, что вид находится на грани вымирания (Pugener, Maglia, 2009).

Такой подход основан на теоретическом представлении, что в оптимальных условиях развития

Частота встречаемости различных аномалий осевого скелета в серии лабораторного выращивания *Bufo bufo*. N – норма строение признака, HA – нарастающая асимметрия, HC – нарушение сегментации, ШП – шахматный порядок элементов (терминология по Коваленко, 1992), римские цифры (I–X) – порядковые номера элементов

Признак				Экземпляры	Доля от общего числа исследованных, %	
Сегментация	Синдром HC	с эффектом HA	с ШП	с нечетным слиянием	34	2.08
				со свободным полупозвонком	15	0.92
				всего	46	2.82
		всего		98	6	
всего		111	6.8			
N	всего		1522	93.2		
Позвонки	число туловищных позвонков	аномальное	8	5	0.31	
			8.5	10	0.61	
			9.5	16	0.98	
			10	8	0.49	
			другие варианты	2	0.12	
			всего	41	2.51	
	N		9	1592	97.49	
	развитый закрестцовый позвонок (X)	свободный	целый	9	0.55	
			левая часть	2	0.12	
			правая часть	7	0.43	
			всего	18	1.1	
		несвободный	целый	14	0.86	
			левая часть	3	0.18	
			правая часть	12	0.74	
			всего	29	1.78	
	всего		47	2.88		
	N		1586	97.12		
	варианты слияния позвонков	тела и невральные дуги	череп + I + II	1	0.06	
			череп + I	1	0.06	
			I + II	13	0.8	
			II + III	1	0.06	
			III + IV	3	0.18	
			IV + V	1	0.06	
			V + VI	6	0.37	
			VIII + IX	3	0.18	
			IX + ур	3	0.18	
			IX + X свободный	1	0.06	
всего		33	2.02			
дистальные части поперечных отростков		II + III	81	4.96		
		III + IV	1	0.06		
		IV + V	3	0.18		
	V + VI	2	0.12			
	всего	87	5.33			

Таблица. Окончание

Признак		Экземпляры	Доля от общего числа исследованных, %		
Сочленовные отростки	презигапофизы на I позвонке	левый/правый	5/4	0.31/0.25	
		оба	1	0.06	
		всего	10	0.61	
		норма	1623	99.39	
	граница “туловище–хвост”	презигапофизы на X позвонке	левый	14	0.87
			правый	23	1.41
			оба	14	0.86
			всего	51	3.12
		постзигапофизы на IX позвонке	левый/правый	55/74	3.37/4.53
			оба	54	3.31
			всего	183	11.21
			N	всего	1450
	Поперечные отростки	поперечные отростки на уростиле	левый/правый	27/43	1.65/2.63
оба			11	0.67	
всего			81	4.96	
форма предкрестцовых отростков		бифуркация	левый/правый	33/45	2.02/2.76
			оба	25	1.53
			всего	91	5.57
		N	всего	1530	93.69
крестцовые отростки		аномалии	1	4	0.25
			1 и 1 (на разных позвонках)	16	0.98
			2 отростка не на IX позвонке	11	0.67
			3	26	1.59
			4	2	0.12
			всего	59	3.61
		N	всего	1574	96.39
число предкрестцовых отростков		отклонения в числе отростков	всего	387	23.7
		N	всего	1246	76.3

должна воспроизводиться только норма строения. А все отклонения от нее объясняются теми или иными причинами, нарушающими нормальный путь онтогенеза (Коваленко, 2003а). Этот взгляд диктует доминирующая ныне концепция эволюции (современный дарвинизм или СТЭ). Хотя прямо в ее положениях этого не сказано (см. Воронцов, 2004), но это легко читается из контекста работ на тему “история эволюционного учения” (История биологии, 1972; Чайковский, 2003; Воронцов, 2004; Назаров, 2005). Альтернативной версией по этому вопросу является концепция эпигенетической эволюции (см. Шишкин,

2006). Она предполагает, что онтогенез при прочих равных, имеет не один, заранее заданный путь, а несколько возможных и разнорезультатных решений (и, соответственно, несколько разных результатов развития).

К сожалению, прямой путь к проверке этих альтернативных версий пока не был предложен и вопрос до сих пор остается открытым. Действительно, как возможно проверить, однозначен ли результат онтогенеза конкретной особи или имеется некоторое число возможных результатов, если каждая особь проходит развитие всего один раз? Но может быть, решение следует искать в проверке

результатов развития всех потомков, полученных от одной пары производителей, выращенных в одинаковых и примерно оптимальных условиях в лаборатории? Такая группа будет практически изолирована от факторов естественной элиминации, т.к. к минимуму сведены многие воздействия внешней среды, влияющие на результат развития (хищники и паразиты, колебания температуры, наличие корма и пр.). Насколько определен будет результат развития в таких условиях? Какое число вариантов строения, кроме нормы, проявится и с какой частотой? Ответы на эти вопросы, позволят хотя бы косвенно судить о том, насколько консервативен онтогенез.

Кроме того, с аномалиями как дефинитивного строения (см. обзор Коваленко, 1992), так и с отклонениями на разных стадиях развития (см., например, Pugener, Maglia, 2009) исследователи постоянно сталкиваются и их необходимо как-то интерпретировать. Но если нет образца для сравнения (точки отсчета), то сделать это невозможно и полученная информация предстает лишь в качестве голых фактических данных. Иными словами, для практики научной работы, ощущается острая потребность в освещении статистических данных по индивидуальной изменчивости. Но эту потребность не могут удовлетворить даже работы по суммированию разрозненных данных (Шимкевич, 1907; Войткевич, 1963; Dubois, 1979; Шишкин, Макридин, 1988; Балахонов, 1990; Коваленко, 1992 и мн. др.).

Таким образом, в сумме с теми вопросами, которые стоят в области эволюционного учения, назрела необходимость в направленном получении статистических данных по изменчивости (аномалиям) для практических целей науки. А именно — необходимость создания таблиц по результатам “аномального развития” (хоты бы для модельных видов).

В связи с этим, цель данной работы состоит в том, чтобы определить, какое число вариантов строения и с какой частотой может дать группа потомков одной пары производителей бесхвостых амфибий, которая развивалась в одинаковых условиях, приближенных к оптимальным (реальный диапазон аномалий). В качестве модельного объекта выбран один из хорошо изученных видов бесхвостых амфибий — серая жаба *Bufo bufo* (сем. Bufonidae).

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1) взять пару производителей из природной популяции во время сезона размножения и создать условия для их спаривания и икротетания в лаборатории;

2) вырастить всех полученных личинок до стадии окончания метаморфоза (когда основные признаки посткраниального скелета сформированы);

3) провести анализ всех полученных потомков (в том числе, по возможности, и погибших во время развития) на внешнее строение и строение посткраниального скелета.

Признаки посткраниального скелета выбраны потому, что многие из них для бесхвостых амфибий имеют диагностическое значение и за 150 лет изучения накоплена обширная информация по их нормальному строению, а также различным вариантам отклонения от него у разных видов (см. Коваленко, 1992, 1999, 2000а; Коваленко, Данилов, 2006а, б).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В мае 1996 года, в разгар сезона размножения, была взята пара производителей *Bufo bufo* из природной популяции в окрестностях г. Санкт-Петербурга — поселок Толмачево (в дальнейшем — серия VI-96).

Пары была изъята в состоянии амplexуса и примерно через 3 часа доставлена в лабораторию. В лаборатории она была помещена в аквариум с водой. За время перемещения производителей амplexус не был прерван. Примерно через 12 часов после доставки в лабораторию пара приступила к икротетанию.

После откладки яиц, икра была размещена в несколько емкостей с водой с учетом оптимальной плотности будущих личинок (Коваленко, Данилевская, 1991). Условия для развития личинок создавались в лаборатории по стандартной методике, разработанной для травяной лягушки *Rana temporaria* (Дабагян, Слепцова, 1975).

Весь полученный материал (погибшие в ходе развития и успешно закончившие метаморфоз) фиксировался в 4% формальдегиде. В дальнейшем из него изготавливались тотальные препараты, дифференцированно окрашенные на хрящ и кость, и просветленные в глицерине (Wassersug, 1976). Всего от этой пары получено и исследовано 1633 потомка. Описание аномалий проводилось по методике Коваленко (Коваленко, 1992).

В тексте статьи (в таблице и на рисунках) римские цифры обозначают порядковой номер позвоночного сегмента или его части (а также — порядковый номер серии в коллекции).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Нормальное строение позвоночника серой жабы

Дефинитивный позвоночник *B. bufo* состоит из 9 туловищных позвонков и уростиля (рис. 1). Крестцовым позвонком является IX-ый. Все туловищные позвонки, а также крестцовый с уростилем, подвижно сочленены друг с другом (слияний нет). Тела всех туловищных позвонков процельные (передневогнутые), развитие проходят по перихордальному типу. I позвонок несет на переднем

конце две суставные площадки, осуществляющие сочленение с затылочными мышцелками.

Невральные дуги предкрестцовых позвонков имеют хорошо развитые сочленовные отростки (пре- и постзигапофизы), кроме I позвонка, который не имеет презигапофизов. Последний туловищный позвонок (крестцовый) сочленен с уростилем с помощью 2-х мышцелков. Его невральные дуги не имеют постзигапофизов. Крестцовый позвонок один (IX-ый), он несет два крестцовых диапофиза, которые умеренно расширены на дистальном конце (рис. 1). Крестцово-тазовое сочленение соответствует типу ПА (по Emerson, 1979).

Все закрестцовые позвоночные сегменты объединены в единую структуру – уростиль. Свободного, не слитого с уростилем, закрестцового позвонка нет. На переднем конце уростиль несет две суставные площадки, обеспечивающие подвижное сочленение с телом крестцового позвонка. Ни сочленовных, ни поперечных отростков на уростиле нет. Невральные дуги туловищных позвонков не перекрываются (*nonimbricate*, Trueb, 1973). I позвонок не несет поперечных отростков. Поперечные отростки II, III и IV позвонков увеличены в длину и расширены на дистальном конце.

Индивидуальная изменчивость осевого скелета

При анализе изменчивости мы учли практически все диагностические признаки осевого скелета бесхвостых амфибий (Duelman, Trueb, 1986), кроме деталей строения сочленовных поверхностей, поскольку материал был представлен тотальными (нерасчлененными) препаратами.

1. Общее соответствие норм строения

Всего зарегистрировано более 50 вариантов изменчивости осевого скелета (таблица). Все диагностически важные признаки, перечисленные выше, демонстрируют отклонения строения в индивидуальной изменчивости. Одновременно, каждый из них показывает ярко выраженную норму по частоте встречаемости – отдельные варианты аномалий составляют единицы % (а многие – всего лишь десятые, и даже сотые доли %). Норма у подавляющего большинства признаков проявляется с частотой около 90%, а у многих – даже выше. Исключение составил признак “число предкрестцовых поперечных отростков” – у сеголеток серой жабы норма этого признака встречается у 76.3% (таблица).

Хотя ни один из исследованных признаков не показал 100% частоту нормы строения, можно полагать, что развитие группы прошло “с эффектом нормы признаков” (Коваленко, 2000б). Но, как и предполагалось (Коваленко, 2003б), число особей полностью соответствующих норме строения зависит от количества признаков, которые мы учитываем в анализе. Это легко показать с помощью полученных количественных данных. Всего у се-

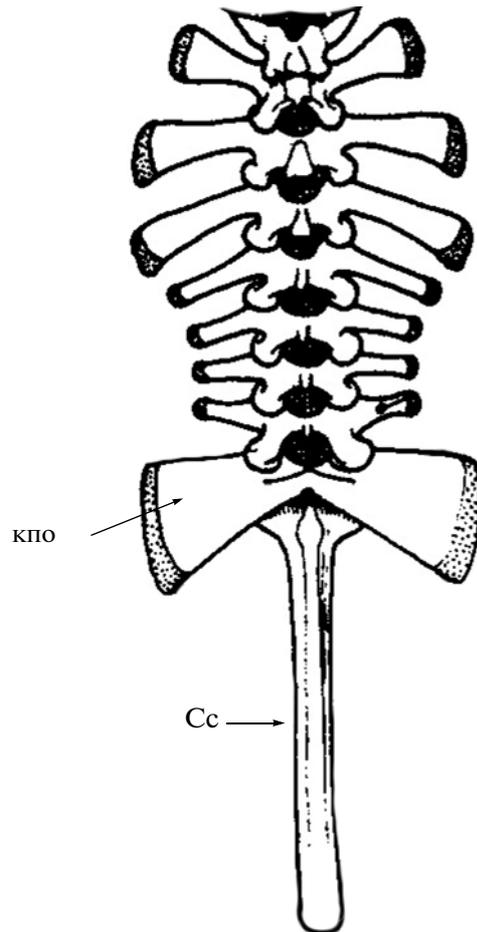


Рис. 1. Строение нормального дефинитивного осевого скелета *Bufo bufo* (по Boulenger, 1898, с изменениями). кпо – крестцовый поперечный отросток, Сс – уростиль.

рой жабы в данной серии описано 652 экз., имеющих отклонения от нормы строения осевого скелета (39.9%). Следовательно, норма по сумме только диагностических признаков составляет всего 60.1%. При этом, не учитывались *незначительные* отклонения, например, в длине и направлении поперечных отростков, неполная симметрия элементов позвонков правой и левой стороны, вариации в форме суставных элементов и др.

Иными словами, даже при развитии в оптимальных условиях норма ни одного признака не достигает 100% и, соответственно, норма строения всегда будет ниже 100%. Напрашивается вывод, что сами по себе аномалии не могут являться показателями нарушения условий развития (показателями неблагоприятных условий).

2. Число туловищных позвонков

Для серой жабы, как и для большинства видов бесхвостых амфибий, в норме характерно 9 туловищных позвонков. Среди известных норм строения у современных и вымерших представителей

отряда встречаются следующие варианты: 7, 8, 9 и 10 позвонков (Ritland, 1955; Lynch, 1973; Ruiz-Caranza, Hernander-Camacho, 1976; Коваленко, Данилов, 2006а). В индивидуальной изменчивости бесхвостых амфибий ранее были отмечены все эти варианты (Trueb, 1973; см. обзор Коваленко, 1992). Но кроме этого, нами описаны варианты, которые не встречаются среди норм строения — своеобразные промежуточные состояния — например, 8.5 и 9.5 позвонков (Коваленко, 1983, 1992, 2000а). Общая морфогенетическая причина формирования “нецелого” числа позвонков установлена (Коваленко, 1983, 2000а) и является общей для всех позвоночных животных (синдром “НС” — синдром нарушения сегментации). Суть ее сводится к нарушению сегментации на ранних стадиях развития и ее следствиям, что будет рассмотрено ниже. В данном разделе статьи остановимся на статистике по вариациям в “целом” числе позвонков (таблица).

Норма по этому показателю очень высока — 97.49% сеголеток имеет 9 туловищных позвонков (1592 экз.). Отклонения в “целом” числе позвонков показали 13 особей (всего 0.8%), из них у 5 экз. встречено 8 позвонков (0.31%) и у 8 экз. 10 позвонков (0.49%).

3. Синдром “НС” — нарушение сегментации

Самая общая причина синдрома — это нарушение сегментации, которая может затрагивать всего 1–3 сегмента или все сегменты тела. Последствия этого процесса для формирования осевого скелета нами рассмотрены и вошли в классификацию аномалий позвоночника (Коваленко, 1992, 2000а). Локальное нарушение сегментации отражается на строении незначительного числа сегментов и, как правило, не имеет серьезных следствий для конечного варианта строения. Оно выражается обычно в незначительных изменениях размера и формы одного–трех позвонков или лишь их отдельных частей. Если же сбой сегментации затрагивает все сегменты тела (или большую их часть), то возникает разветвленная система следствий, которая дает сразу множество вариантов конечного развития. Эти варианты (множество аномалий) в упомянутой выше классификации были объединены в одну группу, общим для которой является эффект “нарастающей асимметрии” — синдром “НА” (Коваленко, 1983, 2000а), т.е. это часть аномалий синдрома “НС”.

Суть причин синдрома “нарастающей асимметрии” сводится к следующему. Длины правых и левых сегментов оказываются неравными, но если сегменты одной стороны примерно равны (а они обычно равны), то возникает несоответствие в положении сегментов противоположных сторон. Противоположные сегменты смещены относительно друг друга и это несоответствие увеличивается в каудальном направлении (асимметрия нарастает к каудальному концу тела; рис. 2г). Отсюда и термин — “нарастающая асимметрия”. Конеч-

ный вариант развития зависит от нескольких параметров (Коваленко, 2000а), главным из которых является: насколько различаются длины противоположных сегментов. Чем больше эта разница, тем больше смещены сегменты, тем больше их границы не совпадают и тем быстрее нарастает асимметрия в их расположении к каудальному концу (рис. 2г). В зависимости от результатов сегментации, возникает целый ряд аномалий, среди которых чаще всего обращают на себя внимание следующие (таблица):

1) асимметричное строение позвоночника, которое в крайнем проявлении может сопровождаться сколиозами;

2) шахматный порядок зачатков (а в дальнейшем развитии и половинок) позвонков;

3) слияние нечетного числа закладок позвонков (при ярко выраженном их шахматном порядке) — от 3-х до 5-ти половинок, что ведет к крупным блокам слияний;

4) при слиянии нечетного числа закладок может оставаться свободная половинка позвонка (часто именуемая в литературе “вставочный сегмент”; см. Коваленко, 1983); в зависимости от степени нарастания асимметрии, такой элемент может сформироваться в передних, средних или задних сегментах позвоночника, но согласно принципу “нарастания асимметрии”, вероятность такого события, конечно, выше в задних отделах позвоночника;

5) в соответствии с предыдущим пунктом, может сформироваться нечетное число туловищных позвонков (7.5; 8.5; 9.5; а у видов, имеющих в норме 10 туловищных позвонков, вполне можно ожидать вариант и 10.5 туловищных позвонков).

Частота встречаемости синдрома “НС” (таблица)

Внешние признаки синдрома “нарушение сегментации” прежде всего, регистрируются по асимметричному строению позвоночника. И здесь возникает трудность, т.к. абсолютно симметричный позвоночник, даже у бесхвостых амфибий (самых короткотельных позвоночных) практически не встречается. Иными словами, даже при нормальной сегментации полная симметричность позвоночника тем менее вероятна, чем большее число признаков мы возьмем в анализ. Если учитывать все детали строения (форму невральных дуг, размер их сочленовных отростков, размер и форму их поперечных отростков, а также направление последних и пр.), то предполагаемую норму строения выделить просто не представится возможным.

И все же, если принять, что сбой сегментации имеют обязательным следствием смещение закладок позвонков, то норму выделить можно. По нашим данным у серой жабы (в данной серии) норма по признаку “нормальная сегментация” представ-

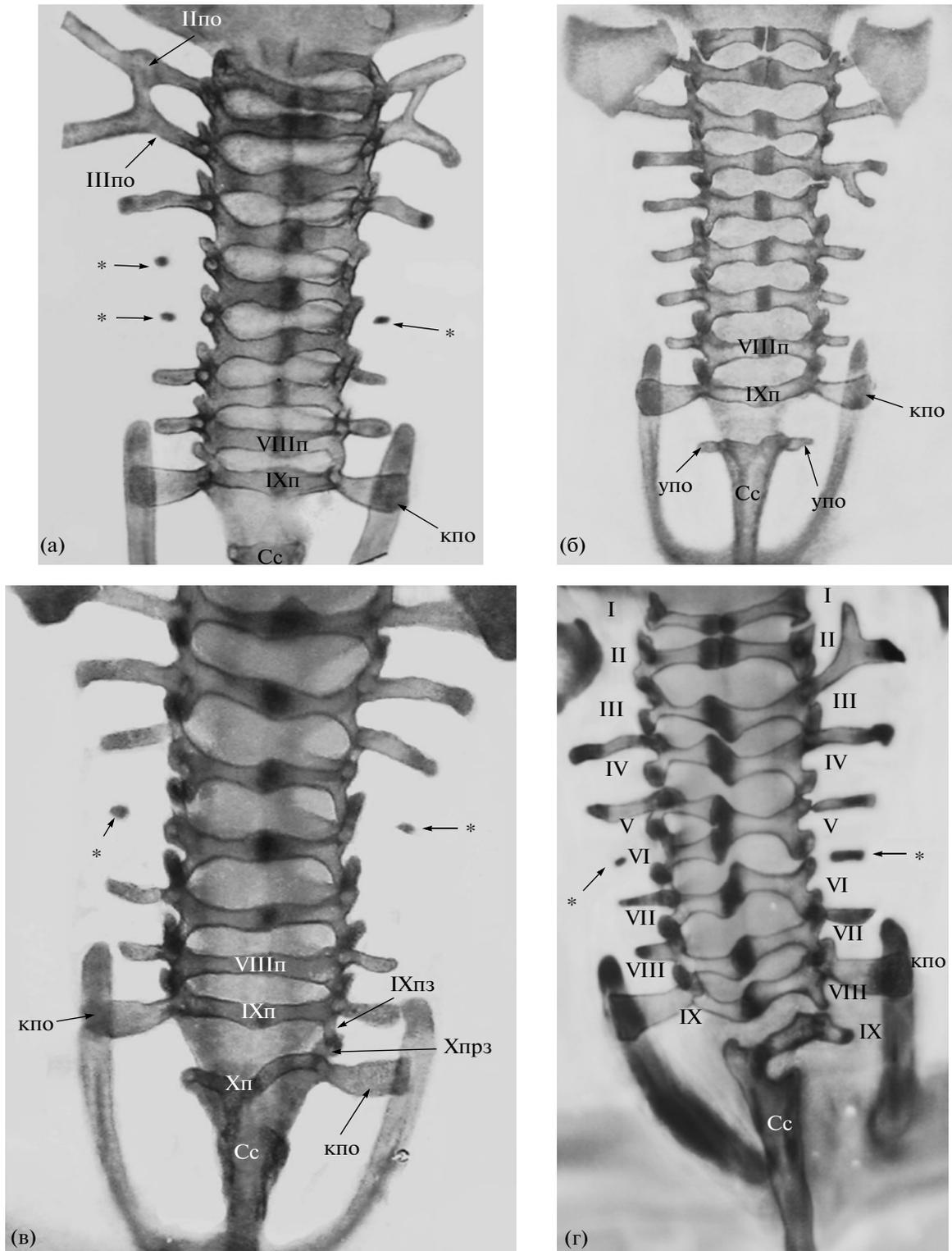


Рис. 2. Варианты осевого скелета сеголеток *Bufo bufo*; фотографии тотальных просветленных препаратов (вид сверху). Масштаб не соблюден. * – обозначает автономный хрящевой элемент. Римские цифры (I–X) – порядковый номер элементов. нд – невральная дуга, п – позвонок, пз – постзигапофиз, по – поперечный отросток, прз – презигапофиз, упо – уростильный поперечный отросток. Остальные обозначения те же, что и на рис. 1.

лена у 1522 экз. (93.2%). Т.е. отклонения по этому признаку составляют около 7%. Но только часть из них представляет синдром “НА”, а именно эта часть дает большинство аномалий, которые явно привлекают внимание исследователей.

*Частота встречаемости синдрома “НА”
(таблица)*

На тотальных препаратах сеголеток зарегистрировать признаки синдрома довольно легко, поскольку степень асимметрии элементов увеличивается к заднему отделу тела. Правда, при быстро нарастающей асимметрии, следствием которой часто бывает слияние нечетного числа закладок позвонков (см. выше), внешний эффект может маскироваться (рис. 2г). Складывается впечатление, что асимметрия элементов, которая была ярко выражена в передних (или средних) отделах туловища постепенно нивелируется, и последующие сегменты выглядят вполне симметрично. Но, обычно, это происходит из-за того, что в предкрестцовом отделе происходит слияние нечетного числа закладок (см. подробно в Коваленко, 1992, 2000а). Даже если позвоночник выглядит симметричным в заднем отделе, то зарегистрировать синдром “НА” практически можно просто посчитать число закладок слева и справа (если оно неравно, то произошло нарушение сегментации в рамках синдрома “НА”).

В серии VI-96 серой жабы синдром “НА” встречен у 98 экз. (6%). Высокой степенью проявления синдрома можно считать то, что сегменты смещены настолько, что образуют шахматный порядок в каком-то участке туловища (рис. 2г). Такой вариант строения отмечен у 46 экз. (2.82%). Шахматный порядок закладок не всегда сопровождается слиянием нечетного числа закладок позвонков; такие слияния отмечены у 34 экз. (2.08%). В свою очередь, слияние нечетного числа закладок не всегда приводит к формированию свободного полупозвонка; наличие такого элемента отмечено только у 15 экз. (0.92%). Следствием нарастающей асимметрии в позвоночнике являются еще несколько вариантов аномалий (Коваленко, 1992, табл. 7). Здесь обратим внимание только на те, что в первую очередь касаются диагностических признаков (количественные данные приведены для данной серии серой жабы):

1) “нецелое” число туловищных позвонков; отмечены случаи 8.5 позвонков (10 экз., 0.61%) и 9.5 позвонков (16 экз., 0.98%);

2) формирование дополнительного позвоночного сегмента позади IX позвонка (который в норме является последним туловищным); такой элемент называют свободным закрестцовым позвонком (т.к. в норме он входит в состав уростиля).

Обычно (в норме) у бесхвостых амфибий все позвоночные сегменты, формирующиеся позади

последнего туловищного позвонка (крестцового), оказываются полностью объединенными в единую структуру — уростиль. И только самые передние его сегменты могут в той или иной мере сохранять следы сегментации (чаще всего, только отверстия для выхода спинномозговых нервов) и именно они обычно служат критерием для определения, сколько хвостовых позвонков вошло в состав уростиля. Этот же критерий нередко используют для диагноза сложного крестца Anura (Noble, 1931; Trueb, 1973; Duellman, Trueb, 1986).

Согласно общепринятой версии о том, что укорочение позвоночника у *Salientia* шло за счет постепенного включения последних туловищных позвонков в уростиль (см. Duellman, Trueb, 1986), все случаи наличия автономных закрестцовых позвонков (как в вариантах нормы, так и в вариантах изменчивости) рассматриваются, как примитивное состояние.

4. Закрестцовый позвонок

В качестве нормы строения автономный закрестцовый позвонок у современных бесхвостых амфибий не встречается. Но среди вымерших форм такое строение описано. Прежде всего, это *Notobatrachus* из поздней юры Аргентины (Estes, Reig, 1973), у которого было 10 туловищных позвонков и, судя по представленной авторами реконструкции, закрестцовый позвонок (XI-ый), имел четкую границу с уростилем. Этот факт интерпретируют, как подвижное сочленение закрестцового позвонка с уростилем. Но у современных бесхвостых амфибий в индивидуальной изменчивости передний сегмент уростиля нередко демонстрирует выраженную границу, оставаясь, при этом, в неподвижной связи с ним. Кроме того, такую стадию развития проходят метаморфозные особи и ранние сеголетки многих видов, даже таких, у которых в дефинитивном состоянии крестцово-уростильный отдел полностью объединен единой костной манжеткой (Pipidae; Коваленко, 1999). Так, Нево описал несколько форм пипид из нижнего мела Израиля *Cordicephalus gracilis*, *C. longicostatus* и *Thoraciliacus rostriceps* (Nevo, 1968), у которых он отметил 1 (и даже больше) закрестцовых позвоночных сегмента при 9 туловищных позвонках. У *Thorociliacus* — у 76% исследованных экземпляров имелся один закрестцовый, а для *Cordicephalus* — два и более закрестцовых (у 68.4% исследованных). Однако такой диагноз вызвал серьезные сомнения (Коваленко, 1999). Нами было выдвинуто предположение, что такое строение этих вымерших форм отражает всего лишь стадию онтогенеза сеголеток ксенопоидного типа вскоре после метаморфоза, когда процесс окостенения осевого скелета еще не полностью закончен. Заметим, что как норма строения автономные закрестцовые не характерны ни для *Palaeobatrachidae* (сестринской группы для Pipidae), ни для *Rhinophrynidae* (сестринской группы для Pipimorpha), ни для *Peloba-*

toidea (сестринской группы для Pipoidea) и встречаются только среди археобатрахий. У ранних сеголеток шпорцевой лягушки передние закрестцовые сегменты некоторое время могут сохранять хорошо различимые границы между собой, хотя сочленение между ними неподвижное. А в течение первого года жизни костная манжетка практически полностью маскирует все следы автономной закладки передней части уростиля.

В качестве варианта индивидуальной изменчивости автономные закрестцовые позвонки (или следы их автономного развития) особенно характерны для семейств археобатрахий (Ritland, 1955; Madej, 1965; Lynch, 1973 и др.), где автономное развитие может захватывать не один хвостовой сегмент. Но и среди необатрахий такие варианты не входят в число запретов, хотя вероятность их проявления существенно ниже, чем, например, у дискогоссид (см. Коваленко, 2000а). Кроме того, у необатрахий даже в индивидуальной изменчивости не встречается более 1 закрестцового позвонка (Коваленко, 1992, 2000а).

В индивидуальной изменчивости Anura встречаются разнообразные варианты автономного (или частично автономного) развития закрестцового сегмента. Закрестцовый элемент может быть полностью автономным (подвижно сочленен как с крестцовым позвонком, так и с уростилем). Автономной может быть только одна из его половинок (правая или левая). Но кроме этого, нередко встречаются варианты, когда закрестцовый элемент, входя в состав уростиля, демонстрирует признаки развития, характерные для свободных туловищных позвонков (сохраняет следы автономного развития).

Приведем статистику по интересующей нас серии серой жабы (VI-96). Для этого вида не отмечено развитие более 1 закрестцового сегмента (таблица). Прежде всего, все случаи этой группы аномалий следует разделить на 2 подгруппы: а) полностью “свободный закрестцовый”, который подвижно сочленен и с крестцовым позвонком, и с уростилем; б) “несвободный закрестцовый” — входит в состав уростиля, но сохраняет следы автономного развития (четкую границу с уростилем, невральную дугу, развитую больше, чем обычно для хвостовых сегментов, развитые презигапофизы и пр.).

Такие варианты встречены всего у 47 экз. (2.88%), следовательно, норма по этому признаку составляет более 97%. “Развитый закрестцовый”, но “несвободный” (Х-ый) встречается чаще (29 экз., 1.78%), чем полностью “свободный” (18 экз., 1.1%) (таблица).

Побочный интерес представлял вопрос о симметричности появления этого признака. Как проявляется асимметричная аномалия (свободный или развитый полупозвонок) на сторонах тела билатерально симметричного животного? Теорети-

чески можно было ожидать примерно одинаковое проявление, но анализ показал другие результаты (таблица). Проявление закрестцового полупозвонка (полностью свободного или просто развитого) на правой стороне тела показывает значительно более высокую частоту (всего 19 экз., 1.16%), чем на левой стороне (всего 5 экз., 0.31%).

5. Рудиментарные поперечные отростки на уростиле

Поперечные отростки в хвостовом отделе позвоночника у бесхвостых амфибий (на уростиле или автономных закрестцовых элементах) встречаются и в качестве нормы строения, и как довольно распространенные варианты индивидуальной изменчивости. Но следует различать два варианта строения этих отростков:

1) рудиментарные отростки, обычно очень короткие, сильно загнутые назад и заостренные на дистальном конце;

2) хорошо развитые поперечные отростки, которые по величине и форме подобны крестовым диапофизам данного вида (и, соответственно, расширены на дистальном конце).

Первый вариант встречается как среди норм строения, так и в качестве индивидуальной изменчивости, второй — только как отклонение от нормы строения. Случаи дополнительных крестцовых диапофизов мы рассмотрим отдельно (в части, посвященной крестцовому отделу), а здесь остановимся на вариантах “рудиментарных” поперечных отростков.

Такие отростки являются диагностическим признаком целого ряда форм Anura из числа примитивных семейств. Сам признак, так же как и наличие свободных закрестцовых позвонков традиционно считается примитивным (Lynch, 1973; Trueb, 1973). А, кроме того, рудиментарные поперечные отростки уростиля отмечены в качестве аномалий у представителей самых разных семейств (в том числе и продвинутых), а у видов, имеющих в норме 1 пару таких отростков, описаны случаи формирования дополнительной пары (*Ascaphus truei*, Ritland, 1955; *Bombina*, Madej, 1965; см. также Коваленко, 1992). Так, например, в индивидуальной изменчивости *Rana temporaria* такая аномалия составляет 2.3% (Коваленко, 1992).

Среди сеголеток серой жабы данной серии мы отметили 81 экз. (4.96%), у которых встречен этот признак. При этом пара рудиментарных отростков имела у 11 экз. (0.67%), только правый — у 43 экз. (2.63%), только левый — у 27 экз. (1.65%). Таким образом, и по этому признаку наблюдается асимметрия проявления аномалий на правой и левой стороне.

6. Сочленовные отростки

В норме у всех бесхвостых амфибий сочленовные отростки развиты на всех свободных (подвижно сочлененных) позвонках (невральных дугах), кроме следующих сегментов:

1) I позвонок не имеет презигапофизов;
 2) крестцовый позвонок не имеет постзигапофизов, даже если он подвижно сочленен с уростилем;

3) первый закрестцовый сегмент не имеет ни презигапофизов, ни постзигапофизов даже если он в норме автономен.

Наличие презигапофизов на I позвонке, по-видимому, очень редкая аномалия. Во всяком случае, в литературе она до сих пор не была описана. У серой жабы мы отметили 10 экз. (0.61%), у которых эти элементы были развиты: развиты оба передних сочленовных отростка — 1 экз. (0.06%); развит только правый — 4 экз. (0.25%); развит только левый — 5 экз. (0.31%). Как видно, по этому признаку асимметрии проявления нет.

Все случаи развития сочленовных отростков на границе туловищного и хвостового отдела относятся к вариантам индивидуальной изменчивости (отклонениям от нормы строения для отряда в целом). Единичные случаи таких отклонений ранее описаны (см. Коваленко, 1992), но обычно им не уделяли специального внимания и их можно было зарегистрировать только по представленным авторами рисункам. И уж тем более не проводился специальный анализ корреляций между формированием постзигапофизов на крестцовом позвонке и презигапофизов на переднем закрестцовом сегменте. Наш объемный материал позволил это сделать.

В данной серии серой жабы норма по этому признаку (нет сочленовных отростков на границе “туловище—хвост”) хорошо выражена — 1450 экз. (88.79%). Остальные 183 экз. (11.2%) показали несоответствие известной норме строения для этого вида. У них в разной мере были сформированы постзигапофизы IX позвонка. Два таких сочленовных отростка отмечены у 54 экз. (3.31%), только правый — у 74 экз. (4.53%), только левый — у 55 экз. (3.37%). Формирование презигапофизов на закрестцовых сегментах встречается значительно реже и всегда при наличии постзигапофизов на крестцовом позвонке; всего отмечен 51 экз. (3.12%). Два презигапофиза на закрестцовых сегментах показали 14 экз. (0.86%), только правый — 23 экз. (1.41%), только левый — 14 экз. (0.87%). По этим данным видно, что по этому признаку наблюдается асимметрия проявления отклонений на правой и левой стороне тела.

7. Слияние позвонков

В норме у подавляющего большинства Анига (в том числе и у серой жабы) все туловищные позвонки сочленены между собой подвижно (слияний позвонков нет). Подвижное сочленение между крестцовым позвонком и уростилем также представляет собой наиболее частый вариант нормы строения. Однако в целом ряде семейств бесхвостых амфибий встречаются виды, для которых в норме характерно объединение (неподвижное со-

членение) некоторых позвоночных сегментов (Lynch, 1973; Trueb, 1973; Коваленко, 1992; Коваленко, 1999; Коваленко, Данилов, 2006а, б). Среди норм строения встречаются следующие варианты:

1) слияние первых двух позвонков (I + II) — Bufonidae, Dendrobatidae, Myobatrachidae, Paleobatrachidae, Pelobatidae, Pipidae, Ranidae, Rhinodermatidae;

2) слияние в области плечевого пояса — Dendrobatidae;

3) слияние крестцового и предкрестцового позвонков — Bufonidae, Dendrobatidae, Paleobatrachidae, Ranidae;

4) слияние крестцового позвонка и уростиля — Bufonidae, Hylidae, Microhylidae, Pelobatidae, Pipidae, Ranidae;

5) блок слияний (предкрестцовый, крестцовый и уростиль) — Bufonidae, Dendrobatidae, Paleobatrachidae, Pipidae.

Все эти варианты строения воспроизводятся в индивидуальной изменчивости многих видов бесхвостых амфибий, у которых в норме они не встречаются (см. Коваленко, 1992; 2000а). Кроме того, среди отклонений от нормального строения встречается и множество других вариантов объединения позвонков (таблица). Морфогенетические причины слияний между позвоночными элементами были нами ранее подробно рассмотрены (Коваленко, 1992; 2000а). Они позволяют разделить все случаи синартрозозов на две принципиально различающиеся группы:

1. Общее нарушение сегментации с эффектом нарастающей асимметрии (см. выше — синдромы НС и НА и их следствия).

При этом условии в ходе развития происходит объединение разноименных закладок позвонков правой и левой стороны тела, что может сопровождаться слиянием нечетного числа полупозвонков. Такие аномалии характерны для всех позвоночных животных и, соответственно, могут встречаться у всех видов бесхвостых амфибий.

2. Локальное нарушение сегментации, затрагивающее всего 2–3 сегмента тела.

Плотные соединительно-тканые перегородки, формирующихся у эмбрионов анамниот на стадии сегментации (Борхвардт, Коваленко, 1986), разделяют внецеломное пространство зародыша на отдельные сегменты и физически связывают между собой все осевые органы и покровы. Наличие и, особенно, целостность этих перегородок создает условия для автономного развития зачатков позвонков или их отдельных элементов (тел, невральных дуг, поперечных отростков). Нарушение целостности септ приводит к объединению скелетогенного материала соседних сегментов, а, следовательно, к последующему слиянию (вернее, неразделению) большего или меньшего числа позвонков. Чем раньше и чем полнее в онтогенезе будет нарушена целостность септ, тем полнее будут

	I + ч	I + II	II + III	III + IV	IV + V	V + VI	VI + VII	VII + VIII	VIII + IX	IX + ур	IX + Хсв	всего
нд и/или тт	1	13	1	3	1	6			3	3	1	32
дч по			81	1	3	2						87
всего	1	13	82	4	4	8	0	0	3	3	1	119

Рис. 3. Спектр возможных комбинаций состояний признаков “попарное слияние позвонков” (по горизонтали) и “слияние определенных частей позвонков” (по вертикали). “нд и/или тт” – слияние позвонков за счет невральных дуг или тел позвонков; “дч по” – слияние за счет дистальных частей поперечных отростков позвонков. В ячейках указано число экземпляров, у которых встречен данный вариант строения. Остальные обозначения те же, что и на рис. 2.

объединены скелетные зачатки и тем меньше будут сформированы детали строения конкретных скелетных сегментов по сравнению с теми, что формируются в условиях их автономного развития (Коваленко, Данилов, 1994; Коваленко, 2000а).

Встречаемость вариантов слияний позвонков первой группы у серой жабы была рассмотрена выше (в разделе “синдром НА”). Здесь приведем данные по остальным вариантам синартрозов. Синартроз может формироваться между всеми основными частями позвонков или только между некоторыми из них (только телами, только невральными дугами или только между поперечными отростками). Но во всех случаях такое объединение ведет к неизбежному следствию – ограничению подвижности между соседними позвонками, и, следовательно, к невозможности формирования подвижного сочленения (Sullivan, 1974; Hinchliffe, Johnson, 1983; Walker, 1991 и др.). Даже если в ходе онтогенеза произошло слияние только дистальных концов поперечных отростков соседних позвонков, это создает препятствия для формирования нормальных суставов между их телами и невральными дугами, т.к. ограничивает подвижность позвоночных сегментов в целом.

В индивидуальной изменчивости серой жабы объединение двух соседних позвонков (слияния второй группы) отмечено у 119 экз. (7.29%; рис. 3). Из этого числа слияние позвонков за счет объединения тел и/или невральных дуг встречено у 32 экз. (1.96%), а за счет объединения только дистальных частей поперечных отростков – у 87 экз. (5.33%).

Попарное слияние позвоночных сегментов встречается во всех отделах осевого скелета, практически между любыми двумя сегментами (см. данные Коваленко, 1992, табл. 6.3), хотя вероятности этих событий различны. Так, отсутствие диартроза между атласом и черепом для *Anura*, по-видимому, является крайне редким вариантом строения, т.к. в литературных источниках мы не встречали описаний подобных вариантов, кроме собственных данных по травяной лягушке *Rana temporaria* (2 экз.; Коваленко, 1992). У серой жабы такое слияние встречено всего у 1 экз. (0.06%). Отметим, что этот редкий вариант изменчивости (и у травяной лягушки, и у серой жабы) был зарегистрирован при анализе большого объема материала (несколько тысяч экз.).

У серой жабы наибольшую вероятность слияния позвонков за счет тел и невральных дуг имеет первая пара позвонков – I + II (13 экз., 0.8%). Напомним, что такое состояние является нормой строения для представителей целого ряда семейств *Anura*, в том числе и для представителей *Bufo* (см. выше). Следующей по частоте встречаемости является пара V + VI (6 экз., 0.37%). Остальные пары (рис. 3) показывают вероятность от 0.06% (1 экз.) до 0.18% (3 экз.).

Ранее мы отмечали (Коваленко, 1992), что наибольшую частоту слияний показывают сегменты в области крестцового отдела (предкрестцовый + крестцовый, крестцовый + уростиль, а также блоки слияний более 2-х позвоночных сегментов). Приведенные данные по серой жабе, как будто бы не подтверждают это представление. Но,помним, что в этом разделе статьи мы привели статистику по слияниям в условиях отсутствия эффекта “нарастающей асимметрии” и его следствия – шахматного порядка закладок позвонков. Поскольку асимметрия нарастает от первых сегментов тела к каудальному отделу, то наиболее вероятной зоной, где возникает шахматный порядок и, следовательно, слияние разноименных закладок позвонков, являются последние туловищные и хвостовые сегменты. Наши данные по серой жабе это подтверждают – такие слияния позвонков в крестцовом отделе обнаружены у 23 экз. (1.41%).

У серой жабы вне синдрома “нарастающей асимметрии” не отмечены случаи слияний между парами VI + VII и VII + VIII. По-видимому, они имеют крайне низкую вероятность (меньше 0.06%). Но слияния между этими сегментами описаны в условиях синдрома “НА” и у серой жабы (данное исследование; 6 экз., 0.37%), и у ряда других видов (Коваленко, 1992; табл. 6.3).

Совсем иные закономерности показывают варианты слияний позвонков за счет дистальных концов их поперечных отростков. Наибольшую частоту таких слияний показывают сегменты в области пояса передних конечностей (таблица, рис. 3). Прежде всего, это пара позвонков II + III (81 экз., 4.96%), и значительно реже – в следующих за ней 2–3 сегментах (0.06–0.18%).

В норме у буфонид, как и у большинства бесхвостых амфибий, поперечные отростки II, III и IV позвонков существенно длиннее по сравнению

с таковыми других предкрестцовых позвонков (рис. 1). Кроме того, III отросток (а иногда и IV) расширены на дистальном конце. Если дистальные части этих отростков в ходе онтогенеза оказываются сближенными, они могут объединяться; или между ними может формироваться перемычка. Этого условия достаточно, чтобы создать препятствия к подвижности между невральными дугами (и даже телами) этих позвоночных сегментов, а, следовательно, создать условия для частичного (или даже полного) синартроза между самими позвонками.

Кроме попарного слияния позвонков у бесхвостых амфибий встречаются варианты формирования более крупных блоков слияний, например из 3-х позвоночных сегментов (Коваленко, 1992, 1999; Коваленко, Данилов, 1994). У серой жабы мы встретили только один такой случай – череп + I + II (1 экз., 0.06%).

6. Бифуркация поперечных отростков

Бифуркация поперечных отростков (от лат. *bifurcus* – “раздвоенный”) – означает разделение одного отростка на две части (рис. 2а, 2б, 2г). В норме такое строение у бесхвостых амфибий не встречается, но в качестве варианта индивидуальной изменчивости оно известно и описано в качестве единичных случаев для представителей разных семейств (см. Коваленко, 1992; Кружкова, 2008б). Обычно бифуркация затрагивает дистальные части отростков, кроме тех случаев, когда двойные отростки формируются в результате сильного нарушения сегментации и полного слияния соседних позвоночных зачатков на ранних стадиях хондрогенеза.

Норма по этому признаку (отсутствие бифуркации) у серой жабы отмечена у 1530 экз. (93.69%). Как и для других признаков (см. выше), нас интересовало симметричность проявления данной аномалии на разных сторонах тела. Результаты хорошо видны из таблицы (таблица). Только на правой стороне аномалия встречается чаще, чем только на левой (45 экз. – 2.76% и 33 экз. 2.02% соответственно).

7. Недоразвитие предкрестцовых поперечных отростков

Длина и форма поперечных отростков туловищных позвонков у бесхвостых амфибий является одним из диагностических признаков (Trueb, 1973; Lynch, 1973). В качестве нормы строения описаны разные варианты пропорций между отростками, как предкрестцовых, так и крестцовых позвонков. Однако полное отсутствие диапофизов в норме характерно только для первого предкрестцового позвонка. Даже среди вариантов индивидуальной изменчивости у бесхвостых амфибий ранее не были описаны случаи явного недоразвития поперечных отростков.

Норма по этому признаку (имеются все отростки) у серой жабы составляет 76.3% (1246 экз.), со-

ответственно, отклонения составили 23.7% (387 экз.). Из числа последних, на настоящий момент мы *подробно исследовали* только 153 экз. (по признакам – на каких именно позвонках и в какой степени недоразвиты поперечные отростки).

Ранее было показано (Кружкова, 2008б), что развитие поперечных отростков позвонков у бесхвостых амфибий состоит из двух, относительно независимых, процессов. Первый из них касается формирования оснований отростков (их проксимальных частей) и проходит в непосредственной близости от невральных дуг (пространстве, свободном от миомеров). Процесс формирования оснований диафизов прямо не зависит от преобразования миомеров в онтогенезе. Второй этап развития отростков позвонков (их дистальных частей) идет в межмиомерном пространстве (в районе септ, разграничивающих туловищные миомеры). Этот процесс и его результаты существенно зависят от преобразований туловищной мускулатуры, что подтверждено экспериментальными данными (Кружкова, 2008б).

Результаты анализа индивидуальной изменчивости у серой жабы по этому признаку показали следующее. Отмечено несколько вариантов отклонений в развитии диапофизов.

1. Поперечные отростки полностью отсутствуют на одном или нескольких туловищных позвонках. Ни на невральной дуге, ни в соответствующей септе, нет даже следов закладки диапофизов (рис. 2); такой вариант обнаружен у 147 экземпляров (9%).

2. Отсутствует только часть диапофиза (диапофизов) – проксимальная или дистальная.

а) отсутствует только дистальная часть диапофиза; отросток аномально короткий (1 экземпляр; 0.06%);

б) отсутствует проксимальная часть отростка (рис. 2а, 2в, 2г); дистальная же часть может быть развита в разной степени; она может быть представлена лишь маленьким округлым хрящевым образованием, лежащим на самой периферии соответствующего сегмента (рис. 2а, 2в), либо более или менее крупным продолговатым, но все-таки не достигающим до невральной дуги, элементом (рис. 2г). Такая аномалия встречена у 13 экземпляров (0.8%).

3. Поперечный отросток нормальной длины, но очень аномально тонкий (15 экземпляров; 0.91%).

Все перечисленные выше варианты могут встречаться как по отдельности (у разных особей), так и все вместе (у одной и той же особи, рис. 2г). Частота таких проявление аномалии неодинакова на разных позвонках. Наиболее часто отростки отсутствуют на V и VI позвоночных сегментах (рис. 4).

Предварительная проверка на симметричность проявления (рис. 4) показала, что данная аномалия встречается на левой и правой сторонах тела

	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	всего
оба	5	2		18	34	7	2	68
л	11	2	3	31	36	19	6	108
пр	7	2	5	25	32	19	5	95
всего	23	6	8	74	102	45	13	271

Рис. 4. Проявление аномалии “отсутствие поперечных отростков позвонков” на правой и левой сторонах тела. “л” — отсутствует левый поперечный отросток, “оба” — отсутствуют оба поперечных отростка, “пр” — отсутствует правый поперечный отросток. Остальные обозначения те же, что и на рис. 2 и 3.

почти с равной частотой. Небольшое преобладание ее встречаемости наблюдается на левой стороне тела животных.

8. Крестцовые диапофизы

Номер крестцового позвонка (или общее число туловищных позвонков), число крестцовых позвонков, равно, как их размер и форма — диагностические признаки, которые маркируют принадлежность представителя не только к определенному семейству, но даже к уровню организации (примитивное или продвинутое состояние в пределах отряда). Предполагалось, что среди вариантов нормального строения у *Anura*, кроме признака “общее число туловищных позвонков”, варьирует и число позвонков, несущих крестцовые отростки (Lynch, 1973; Trueb, 1973; Duellman, Trueb, 1986). Однако ревизия литературных данных (Коваленко, 1999; Коваленко, Данилов, 2006а) показала, что реально у бесхвостых амфибий в качестве нормы строения встречается только один крестцовый позвонок. Более того, был предпринят специальный анализ развития так называемого “сложного крестца” у гименохирус (*Hymenochirus*), который показал, что чрезвычайно широкие крестцовые крылья у этого вида формируются все же на основе всего лишь одной пары поперечных отростков (Кружкова, 2008а, б). Иными словами, в норме бесхвостые амфибии демонстрируют всего одну пару крестцовых диапофизов, которые несет единственный крестцовый позвонок.

В индивидуальной изменчивости *Anura* описаны случаи как сокращения числа крестцовых диапофизов (Kovalenko, Danilevskaya, 1994; Коваленко, 2007), так и увеличения их числа (см. Коваленко, 1992, 1996, 2000а). Случаи сокращения числа крестцовых диапофизов (редуцированный крестец) представляют собой крайне редкие варианты фоновой индивидуальной изменчивости как в природных популяциях, так и среди потомков, полученных в лаборатории в оптимальных условиях и при развитии группы с эффектом “нормы признака” (Коваленко, 2003б); частота их встречаемости не превышает сотых долей %. Однако редуцированный крестец был нами отмечен у лабораторной шпорцевой лягушки (*Xenopus laevis*), когда на фоне массовых аномалий конечностей и их поясов такой вариант строения крестца становился пре-

обладающим по частоте встречаемости (Коваленко, Кружкова, 2000; Коваленко, 2007, 2011).

Увеличение числа крестцовых диапофизов является самой обычной аномалией в составе индивидуальной изменчивости *Anura*. Такие случаи описаны у представителей разных семейств (архебатрахий, мезобатрахий и необатрахий; см. Коваленко, 1992), а история их описаний насчитывает уже более 150 лет. Частота их встречаемости по представленным в литературе данным составляет от 0.5 до 6–7% у представителей разных семейств (Коваленко, 1992, табл. 6.1). Однако к большинству этих данных следует относиться с осторожностью, т.к. не всегда понятно, особенно у старых авторов, как собраны выборки для анализа — одновременно и в одном месте или составлены из небольших выборок за несколько лет (о сборе выборок для статистики по аномалиям см. у Коваленко, 2000б).

Норма по этому признаку — 2 крестцовых диапофиза на IX позвонке — у данного вида составляет 96.39% (1574 экз.), что показывает явное частотное преимущество такого его состояния. Но кроме нормы строения, отмечен еще целый ряд вариантов индивидуальной изменчивости, которые, в большей или меньшей степени, отличаются от признанной нормы (отклонения от нормы, аномалии). Всего обнаружено 59 экз. (3.61%), которые показали отклонения от нормы по этому признаку.

В представленном здесь материале по серой жабе, были зарегистрированы оба случая — и сокращение числа крестцовых позвонков, и их увеличение.

1. Редуцированный крестец

Понятие редуцированный крестец (Коваленко, Данилевская, 1994; Коваленко, 2000а) подразумевает, что число поперечных отростков, участвующих в сочленении с тазом, сокращено по сравнению с обычным для *Anura* состоянием. Соответственно, меньше двух отростков это — либо один, либо таких отростков нет. В составе вариантов индивидуальной изменчивости серой жабы отмечен первый вариант редуцированного крестца (4 экз.; 0.25%) — один крестцовый позвонок с одним поперечным отростком. Из этого числа 3 экз. демонстрируют сильное нарушение сегментации с эффектом “шахматный порядок закладок” (см. выше синдром “НА”). И только 1 экз. показал такое

строение (1 крестцовый отросток на IX позвонке) при нормальной сегментации (0.06%). Очевидно, что эта аномалия имеет очень низкую вероятность и в онтогенезе серой жабы.

2. Увеличение числа крестцовых диапофизов

Увеличение числа крестцовых отростков, естественно, предполагает, что увеличено и число несущих их позвонков (т.к. один позвонок всегда несет не более 2-х поперечных отростков). Мы не нашли случаев, когда крестцовые диапофизы формировались бы более чем на 2-х соседних позвонках. О том же свидетельствуют и литературные данные (см. Коваленко, 1992, 2000а; Коваленко, Данилов, 2006а).

В индивидуальной изменчивости серой жабы (серия VI-96) отмечено увеличение числа крестцовых отростков до 3-х (26 экз., 1.59%) или до 4-х (2 экз., 0.12%). Дополнительные крестцовые диапофизы могут формироваться на предкрестцовом позвоночном сегменте (VIII позвонке) или на закрестцовом — уростиле или автономном X позвонке.

Нужно заметить, что понятие “дополнительные крестцовые диапофизы” следует понимать как формальное определение (исключительно относительно нормы строения, когда крестцовым позвонком является IX). Среди вариантов индивидуальной изменчивости не всегда удается определить, какой позвонок является основным крестцовым, а какой — дополнительным. Например, если VIII позвонок или уростиль несет 2 полноценных расширенных диапофиза, а IX позвонок — только один такой отросток, то определить, какой из этих позвоночных сегментов является основным крестцовым довольно трудно? Особенно усложняется процедура определения, когда предстоит описать варианты строения, не укладывающиеся в две выше предложенные группы (например, при условии ярко выраженной нарастающей асимметрии).

3. Другие варианты положения крестцовых диапофизов

Формально крестцовых диапофизов может быть два (как в норме), но положение их может отличаться от нормального строения. Для бесхвостых амфибий отмечены следующие варианты (Коваленко, 1992; 2000а):

1) по одному отростку на соседних позвонках; у серой жабы отмечено 16 таких экземпляров (0.98%); из них у 11 экз. крестцовые диапофизы сформированы на IX и VIII позвонках, а у 5 экз. — на IX и первом закрестцовом сегменте;

2) 2 отростка, но не на IX позвонке, а на VIII или X сегменте; у серой жабы отмечено 11 таких экземпляров (0.67%); из них у 5 экз. крестцовые отростки сформированы на VIII позвонке, и у 6 экз. — на X сегменте.

В последнем случае, даже формально, мы обязаны описать в качестве крестцового позвонка тот

сегмент, который несет крестцовые диапофизы. А, следовательно, встает вопрос о числе туловищных позвонков. Если полноценным крестцовым позвонком является VIII позвоночный сегмент, то, следовательно, число туловищных позвонков сокращено до 8, а следующий за ним сегмент (IX-ый) является закрестцовым. Подтверждает это заключение то, что IX позвонок в этом случае действительно имеет все (или многие) морфологические признаки первого закрестцового сегмента (недоразвитая невральная дуга и ее сочленовные отростки, отсутствие поперечных отростков и др.). Если полноценным крестцовым является X сегмент, то очевидно, что число туловищных закладок в онтогенезе было увеличено до 10. При этом X сегмент может по всем (или многим) признакам быть подобным обычному крестцовому позвонку, но не всегда сохранять автономность — он может быть неподвижно сочленен с уростилем.

Описание аномалий в крестцовом отделе бесхвостых амфибий осложняется еще тем, что они коррелятивно связаны между собой. Для того, чтобы выявить закономерности их проявления был предложен анализ “методом спектров” (Коваленко, 1996, 2000а). Результаты его применения к анализу изменчивости крестца у серой жабы на большом фактическом материале (серия VI-96) будут изложены в отдельной статье (см. третью часть данного сообщения).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Исследованная группа прошла развитие с эффектом нормы признаков (то, что принято называть нормальным развитием). Кроме нормы, проявились и варианты обычной для вида изменчивости (фоновой изменчивости).

2. Мы провели подробный анализ всего по 8-ми признакам позвоночника, ориентируясь на важные для диагностики признаки. Каждый из них показывает очень высокую долю нормального варианта строения (минимум — 76.3%; а большинство — 93–99%) и от 2-х до 10 возможных состояний признака в индивидуальной изменчивости (таблица). Следовательно, в большой выборке (такой, какая была у нас в анализе) можно было зарегистрировать не менее 50 вариантов строения, которые отличаются от принятой нормы для данного вида, что и подтвердил анализ серии VI-96 (см. таблицу).

3. Абсолютное число аномальных вариантов, казалось бы, весьма велико. Однако каждый из них имеет очень низкую вероятность реализации. Только единичные аномалии составляют 3–5% от общего числа исследованных, а вероятность большинства вариантов индивидуальной изменчивости исчисляется десятками и даже сотыми долями %.

4. Очевидно, что при таком исходном численном соотношении вариантов вероятность для аномальных комбинаций попасть в поле зрения исследователей не только мала, но во многом зависит от объема исследованных выборок и от того, как эти выборки были выборки собраны.

5. При лабораторном выращивании соблюсти такие условия нетрудно; например, взять в анализ всех потомков одной пары производителей, которые проходили развитие в примерно одинаковых условиях.

В противном случае, если такой возможности нет, сбор фактического материала производится в природной популяции. Результат последнего зависит не столько от объема исследованной выборки, сколько от того при каких обстоятельствах она собрана (Коваленко, 2000б): одно место сбора, объем выборки в один год, один и тот же сезон жизненного цикла и пр. В противном случае, а это часто бывает (условия сбора выборок иные), мы получаем данные только о наиболее вероятных для этого вида вариантах индивидуальной изменчивости.

6. Полученные результаты имеют самостоятельное значение, как источник фактических данных о частоте встречаемости тех или вариантов строения осевого скелета у данного вида (таблица) в примерно оптимальных условиях. Поскольку основное внимание было обращено на диагностические признаки этого отдела, то эта информация может быть использована при решении самых разных вопросов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Балахонов А.В. Ошибки развития. Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1990. 278 с.
- Борхвардт В.Г., Коваленко Е.Е. Септальные перегородки эмбрионов и личинок анамний // ДАН СССР. 1986. Т. 287. № 3. С. 764–768.
- Вершинин В.Л. Материалы по росту и развитию амфибий в условиях большого города // В кн.: Экологические аспекты скорости роста и развития животных. Свердловск, 1985. С. 61–75.
- Вершинин В.Л. Морфологические аномалии амфибий городской черты // Экология. 1989. № 3. С. 58–66.
- Войткевич А.А. Симметричные нарушения закладок задних конечностей у лягушки // ДАН СССР. 1963. Т. 152. № 6. С. 1479–1482.
- Воронцов Н.Н. Развитие эволюционных идей в биологии. М: КМК, 2004. 432 с.
- Дабагян Н.В., Слепцова Л.А. Травяная лягушка *Rana temporaria* L. // Объекты биологии развития. М.: Наука, 1975. С. 442–462.
- История биологии, с древнейших времен до начала XX века. М.: Наука, 1972. 563 с.
- Коваленко Е.Е. Коррелятивные изменения в позвоночнике травяной лягушки *Rana temporaria* // Зоол. Журн. 1983. Т. 62. Вып. 4. С. 564–569.
- Коваленко Е.Е. Аномалии позвоночника бесхвостых амфибий СПб.: Изд-во СПб. ун-та, 1992. 142 с.
- Коваленко Е.Е. Анализ изменчивости крестца Anura. 1. Метод анализа изменчивости крестца бесхвостых амфибий // Зоол. Журн. 1996. Т. 75. Вып. 1. С. 52–66.
- Коваленко Е.Е. Строение крестцово-уростильного отдела в семействе Pipidae (Amphibia, Anura) // Зоол. Журн. 1999. Т. 78. № 1. С. 57–69.
- Коваленко Е.Е. Изменчивость посткраниального скелета бесхвостых амфибий: Автореф. дис. докт. биол. наук. СПб.: ЗАО “Познание”, 2000а. 117 с.
- Коваленко Е.Е. Массовые аномалии конечностей у бесхвостых амфибий // Журн. общ. биол. 2000б. Т. 61. № 4. С. 412–427.
- Коваленко Е.Е. Альтернатива концепции Ч. Дарвина. // В тени дарвинизма. Альтернативные теории эволюции в XX веке. Под. ред. Левита Г.С., Попова И.Ю., Хоссфельда У., Олссона Л. и Брайдабаха О.; СПб: Ясный День, 2003а. С. 192–217.
- Коваленко Е.Е. Эффект нормы признака и его теоретическое значение // Эволюционная биология: история и теория. 2003б. Вып. 2. С. 66–87.
- Коваленко Е.Е. Изменчивость крестца у шпорцевой лягушки *Xenopus laevis* (Pipidae) при aberrантном морфогенезе конечностей // Зоол. Журн. 2007. Т. 86. Вып. 1. С. 66–80.
- Коваленко Е.Е. Свойства нормы и изменчивости // Онтогенез. 2011. Т. 42. № 2. С. 1–15.
- Коваленко Е.Е., Данилов И.Г. Редкие варианты аномального строения позвоночника у бесхвостых амфибий // Вестн. СПб ун-та. 1994. Сер. 3. Вып. 4. № 17. С. 10–24.
- Коваленко Е.Е., Данилов И.Г. Разнообразии крестцово-уростильного отдела в семействе Bufonidae (Amphibia, Anura). 1. Фактическое разнообразие крестца у буфонид // Зоол. Журн. 2006а. Т. 85. № 4. С. 500–516.
- Коваленко Е.Е., Данилов И.Г. Разнообразии крестцово-уростильного отдела в семействе Bufonidae (Amphibia, Anura). 2. Анализ разнообразия методом спектров // Зоол. Журн. 2006б. Т. 85. № 6. С. 725–740.
- Коваленко Е.Е., Кружкова Ю.И. Аномалии задних конечностей у лабораторной шпорцевой лягушки *Xenopus laevis* (Anura, Pipidae). 2. Коррелятивные изменения таза и задних конечностей // Вестн. СПб ун-та. 2000. Сер. 3. Вып. 3. № 19. С. 9–24.
- Кружкова Ю.И. Строение и развитие крестцового отдела позвоночника у *Hymenochirus boettgeri* (Anura, Pipidae) // Вопросы герпетологии. Материалы Третьего Съезда Герпетологического Общества им. А.М. Никольского. 2008а. С. 215–221.
- Кружкова Ю.И. Строение, развитие и изменчивость крестцово-тазового комплекса бесхвостых амфибий (Amphibia, Anura): Автореф. дис. канд. биол. наук. СПб.: Лема, 2008б. 17 с.
- Назаров В.И. Эволюция не по Дарвину: смена эволюционной модели. М.: Ком Книга, 2005. 520 с.
- Неустроева Н.С. Морфологическая изменчивость скелета представителей рода *Rana* в условиях антропогенной дестабилизации среды: Автореф. дис. канд. биол. наук. Екатеринбург: Изд-во ин-та экономики УрО РАН, 2012. 22 с.

- Чайковский Ю.В. Эволюция. “Ценологические исследования”. Вып. 22. М.: Центр системных исследований – ИИЕТ РАН, 2003. 472 с.
- Шимкевич В.М. Уродства и происхождение видов. СПб., М.: М.О. Вольф, 1907. 106 с.
- Шишкин М.А. Индивидуальное развитие и уроки эволюционизма // Онтогенез. 2006. Т. 37. № 3. С. 179–198.
- Шишкин М.А., Макридин В.П. Палеопатологические и палеотератологические исследования // Современная палеонтология. М.: Недра, 1988. Т. 1. С. 219–229.
- Dubois A. Anomalies and mutations in natural populations of the *Rana “esculenta”* complex (Amphibia, Anura) // Mitt. Zool. Mus. Berlin. 1979. Bd. 55. H. 1. S. 59–87.
- Duellman W.E., Trueb L. Biology of amphibians. N.-Y.: McGraw-Hill, 1986. 670 p.
- Emerson Sh.B. The ilio-sacral articulation in frogs: form and function // Biol. J. Linn. Soc. 1979. V. 11. № 2. P. 155–168.
- Estes R., Reig O.A. The early fossil record of frogs: a review of the evidence // Evolutionary biology of the anurans. Columbia: University of Missouri Press, 1973. P. 11–62.
- Hinchliffe J.R., Johnson D.R. Growth of cartilage // Cartilage. V. 2. N.-Y. Acad. Press, 1983. P. 255–295.
- Kovalenko E.E., Danilevskaya S.E. On unique forms of anomalous sacral structure in tailless amphibians // Rus. J. Herpetol. 1994. V. 1. № 1. P. 30–36.
- Lynch J.D. The transition from archaic to advanced frogs // Evolutionary biology of the anurans: contemporary research on major problems. Columbia: University of Missouri Press, 1973. P. 133–182.
- Madej Z. Variations in the sacral region of the spine in *Bombina bombina* (Linnaeus, 1758) and *Bombina variegata* (Linnaeus, 1758) (Salientia, Discoglossidae) // Acta Biol. Cracoviensia. 1965. V. 8. № 2. P. 185–197.
- Nevo E. Pipid frogs from the early cretaceous of Israel and pipid evolution // Bull. Mus. Comp. Zool. 1968. V. 136. № 8. P. 255–318.
- Noble G.K. The biology of the Amphibia. N.-Y.–L., 1931. 577 p.
- Pugener L.A., Maglia. A.M. Skeletal morphogenesis of the vertebral column of the miniature hyloid frog *Acris crepitans*, with comments on anomalies // J. Morphol. 2009. V. 270. P. 52–69.
- Ritland R.M. Studies on the post-cranial morphology of *Ascapus truei*. I. Skeleton and spinal nerves // J. Morphol. 1955. V. 97. № 1. P. 119–177.
- Ruiz-Carranza P.M., Hernander-Camacho J.I. *Osorophryne*, genero nuevo de Anfibios Bufonidos de Colombia y Ecuador // Caldasia. 1976. V. 11. № 54. P. 93–148.
- Trueb L. Bones, frogs and evolution // Evolutionary biology of the Anurans. Columbia, Missouri. 1973. P. 65–132.
- Sullivan G.E. Skeletal abnormalities in chick embryos paralysed with decamethonium. // Aus. J. Zool. 1974. V. 22. № 4. P. 429–438.
- Walker J.M. Musculoskeletal development: a review // Phys. Ther. 1991. V. 71. P. 878–889.
- Wassersug R.J.A. Procedure for differential staining of cartilage and bone in whole formalin-fixed vertebrates // Stain Techn. 1976. V. 51. № 2. P. 131–134.

Individual Variation in the Development of the Common Toad, *Bufo bufo* (Anura, Bufonidae): 2. Diagnostic Characters of the Axial Skeleton

E. E. Kovalenko^a and Yu. I. Kruzhkova^b

^aSt. Petersburg State University, Universitetskaya nab. 7/9, St. Petersburg, 199034 Russia

^bHerzen State Pedagogical University, nab. reki Moiki 48, St. Petersburg, 191186 Russia

e-mail: kovalenko_i@mail.ru

Abstract—Analysis of individual variation in diagnostic characters of the axial skeleton has been performed in all offspring (1633 ind.) from the same spawn of one pair of common toads under conditions of laboratory rearing, with natural elimination being reduced to a minimum. More than 50 skeletal anomalies have been recorded. Factual data are presented that characterize deviations from the species norm in the frequency of “background anomalies” (Kovalenko, 2003). Correlations between manifestations of different variants of character states are considered. The problem of norm and anomaly in individual variation is discussed.

Keywords: *Bufo bufo*, postcranial skeleton, individual variation, background anomalies, diagnostic characters.

УДК 597.828:591.471.32

ИНДИВИДУАЛЬНАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ РАЗВИТИЯ СЕРОЙ ЖАБЫ *BUFO BUFO* (ANURA, BUFONIDAE). 3. ОГРАНИЧЕНИЯ ИНДИВИДУАЛЬНОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ И ИХ ПРИЧИНЫ

© 2013 г. Е. Е. Коваленко*, Ю. И. Кружкова**

*С.-Петербургский государственный университет,
199034 С.-Петербург, Университетская наб., д. 7/9

**Российский государственный педагогический университет им. А.И. Герцена,
191186 С.-Петербург, набережная реки Мойки, д. 48

E-mail: kovalenko_i@mail.ru

Поступила в редакцию 05.07.12 г.

Окончательный вариант получен 27.12.12 г.

На примере осевого скелета модельного вида бесхвостых амфибий (серой жабы, *Bufo bufo*) проведен анализ фактических ограничений индивидуальной изменчивости. Показано, что состояния признаков не свободно комбинируются между собой. Существуют морфогенетические ограничения, причины большинства которых выявлены данным исследованием. Дана классификация основных факторов, ограничивающих индивидуальную изменчивость в ходе развития.

Ключевые слова: *Bufo bufo*, посткраниальный скелет, индивидуальная изменчивость, морфогенетические ограничения.

DOI: 10.7868/S047514501304006X

Индивидуальная изменчивость — одна из самых важных составляющих практически всех предложенных версий о механизмах эволюции (см. обзоры Чайковский, 2003; Воронцов, 2004; Назаров, 2005; Попов, 2005; Юнкер, Хоссфельд, 2007 и др.). И в тоже время, это одна из самых неисследованных областей биологии, несмотря на огромное число работ, которые формально посвящены именно изменчивости (Коваленко, Попов, 1997). Долгое время казалось, что изменчивость, не подвергнутую элиминации, практически исследовать нельзя. То есть нам доступен только тот материал, который остается в природе после естественной элиминации. Соответственно, проверить одно из основных положений доминирующей концепции эволюции (дарвинизма и его производных, в частности, СТЭ) о неограниченном характере исходной изменчивости не представляется возможным (см. Коваленко, Попов, 1997). Действительно, как получить в природных популяциях материал, не подвергнутый естественной элиминации, если, как предполагается, она действует, начиная с самых первых стадий развития. Причем, в данном случае, даже не важно имеет ли она случайный или выборочный характер, поскольку любая элиминация сокращает потенциальное разнообразие. Единственная возможность хоть как-то приблизиться к решению

этой задачи — это исключить максимально возможное число факторов, способствующих элиминации в естественных условиях (колебания параметров внешних условий, хищники, паразиты и пр.) и тем самым получить материал, отражающий потенциал изменчивости. Следовательно, решение лежит в рамках выращивания потомства в лабораторных условиях. Но обязательными условиями являются: получить максимальное число потомков от одной пары производителей, всех их, по возможности, вырастить до первых стадий дефинитивного состояния и всех исследовать (в том числе, погибших в ходе развития) на внешнее строение и на строение осевого скелета.

В первых двух статьях данной серии (Индивидуальная изменчивость серой жабы...) мы показали, что такая задача была решена. Следовательно, мы можем исследовать практически всю изменчивость, которую способна дать одна пара производителей за одно спаривание. Конечно, потомство одной пары производителей не может отразить весь потенциал изменчивости вида, но может дать представление об общем характере изменчивости, хотя бы о самых общих закономерностях ее проявления и ее ограничениях.

Решению этих задач и посвящена данная статья (третья, заключительная).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Все данные о получении фактического материала представлены в соответствующих разделах первых двух статей серии и в таблице.

Для анализа закономерностей проявления изменчивости и выявления ее ограничений использован метод спектров (Коваленко, 1996а, 2000а).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Все факторы, ограничивающие исходную изменчивость теоретически можно разделить на две группы:

1) ограничивающие количественное проявление каждого из возможных (незапрещенных) вариантов изменчивости;

2) ограничивающие само число возможных вариантов строения (запреты на определенные сочетания состояния признаков).

I. Факторы, ограничивающие количественное проявление возможных для вида вариантов изменчивости

Примем, что прямо доказать ограниченность или неограниченность потенциальной изменчивости мы не можем. Но, независимо от ее характера, мы можем теоретически предсказать, какие факторы могут ограничивать диапазон реальной изменчивости, т.е. той, что доступна нашему наблюдению. Это:

- плодовитость вида;
- показатель нормы его отдельных признаков;
- элиминация.

1. Плодовитость вида

Очевидно, что чем выше плодовитость данного вида, тем большее число вариантов изменчивости может проявиться за один акт размножения. И, соответственно, чем больше таких актов совершит одна пара за свою жизнь, тем полнее будут реализованы ее потенции.

Это хорошо видно на примере нашей серии серой жабы. Всего было получено 1633 потомка. Из них всего 652 экз. (40%) показали отклонения в строении осевого скелета, среди которых отмечено около 50 вариантов изменчивости. Даже если изменчивость, кроме плодовитости, ничем не ограничена, то для того, чтобы зарегистрировать, например, 100 вариантов отклонений, нам потребуется получить от одной пары в два раза больше потомков, а для того, чтобы обнаружить всего 200 вариантов плодовитость должна быть в четыре раза больше (т.е. более 6 тысяч). Иными словами, при любом характере потенциальной изменчивости ее реальное проявление зависит от плодовитости вида (от числа реальных потомков). Остается открытым вопрос о том, как реализуется потенциальная изменчивость вида в последовательных размножениях одной и той же пары. Насколько

нам известно, такую задачу в исследованиях изменчивости пока еще не ставили. Решить ее не так просто, учитывая, что для этого потребуются выращивать всех полученных потомков и всех их исследовать на строение.

2. Показатель нормы строения признаков

Этот показатель не так очевиден исследователям, как предыдущий. Во-первых, потому, что анализом нормы в исследованиях изменчивости часто пренебрегают. Во-вторых, потому, что существует “парадокс нормы” (Коваленко, 2000б). Он заключается в том, что норма признака (признаков) устанавливается легко, а норму строения (как сумму комбинаций из состояний признаков) установить сложно (или даже невозможно), поскольку это зависит от числа привлеченных к анализу признаков. Чем больше признаков мы будем учитывать, тем ниже вероятность того, что все они у одной особи будут демонстрировать нормальное состояние (Коваленко, 2000б).

Материал, представленный в этой серии по серой жабе, хорошо это иллюстрирует. Действительно, норма большинства признаков осевого скелета (из числа учтенных нами) составляет 93–99%, в единичных случаях – 76–88% (таблица). Но норма строения позвоночника *по тем же признакам* составляет всего 60%. При этом целый ряд характеристик позвоночника намеренно не был включен в анализ в данной работе, поскольку мы ориентировались на диагностические признаки. Например, мы не учитывали полное соответствие симметрии элементов позвонков в правой и левой половине тела, длину уростиля, детали строения сочленовных суставов между позвонками и др. (более полный список параметров осевого скелета, варьирующих у Апига, представлен в монографии Коваленко, 1992). Но и так очевидно, что если бы были учтены все признаки, то частота *нормы строения* могла бы упасть до значений отдельных аномалий.

Полученные данные подтверждают тезис, выдвинутый ранее (Раутиан А., Раутиан Г., 1985; Коваленко, 2000а, б) – при анализе индивидуальной изменчивости следует ориентироваться на показатель “норма признака”, который имеет хорошо выраженную частотную характеристику.

Здесь требуется уточнить терминологию. *Признак (морфологический)* – особенность строения, которая у конкретного организма (особи) представлена в одном из его возможных состояний. *Состояния признака* – несколько возможных для данного таксона вариантов строения данного признака. *Норма признака* – 1) факт (явление) преобладания по частоте встречаемости одного из возможных состояний признака среди особей данного вида; 2) состояние признака, которое встречается у подавляющего большинства особей данного вида; ярко выраженная норма признака встречается

Частота встречаемости различных аномалий осевого скелета в серии лабораторного выращивания *Bufo bufo*. N – норма строение признака, НА – нарастающая асимметрия, НС – нарушение сегментации, ШП – шахматный порядок элементов (терминология по Коваленко, 1992), римские цифры (I–X) – порядковые номера элементов

		Признак			Экземпляры	Доля от общего числа исследованных, %
Сегментация	Синдром НС	с эффектом НА	с ШП	с нечетным слиянием	34	2.08
				со свободным полупозвонком	15	0.92
				всего	46	2.82
		всего			98	6
		всего			111	6.8
N		всего			1522	93.2
Позвонки	число туловищных позвонков	аномальное	8	5	0.31	
			8.5	10	0.61	
			9.5	16	0.98	
			10	8	0.49	
			другие варианты	2	0.12	
			всего	41	2.51	
			N	9	1592	97.49
	развитый закрестцовый позвонок (X)	свободный	целый	9	0.55	
			левая часть	2	0.12	
			правая часть	7	0.43	
			всего	18	1.1	
		несвободный	целый	14	0.86	
			левая часть	3	0.18	
			правая часть	12	0.74	
			всего	29	1.78	
	всего			47	2.88	
	N			1586	97.12	
	варианты слияния позвонков	тела и невральные дуги	череп + I + II	1	0.06	
			череп + I	1	0.06	
			I + II	13	0.8	
			II + III	1	0.06	
			III + IV	3	0.18	
			IV + V	1	0.06	
			V + VI	6	0.37	
			VIII + IX	3	0.18	
			IX + ур	3	0.18	
			IX + X свободный	1	0.06	
всего			33	2.02		
дистальные части поперечных отростков		II + III	81	4.96		
		III + IV	1	0.06		
		IV + V	3	0.18		
		V + VI	2	0.12		
		всего			87	5.33

Таблица. Окончание

Признак		Экземпляры	Доля от общего числа исследованных, %		
Сочленовные отростки	презигапофизы на I позвонке	левый/правый	5/4	0.31/0.25	
		оба	1	0.06	
		всего	10	0.61	
		норма	1623	99.39	
	граница “туловище—хвост”	презигапофизы на X позвонке	левый	14	0.87
			правый	23	1.41
			оба	14	0.86
			всего	51	3.12
		постзигапофизы на IX позвонке	левый/правый	55/74	3.37/4.53
			оба	54	3.31
			всего	183	11.21
N			1450	88.79	
Поперечные отростки	поперечные отростки на уростиле	левый/правый	27/43	1.65/2.63	
		оба	11	0.67	
		всего	81	4.96	
	форма предкрестцовых отростков	бифуркация	левый/правый	33/45	2.02/2.76
			оба	25	1.53
			всего	91	5.57
		N	1530	93.69	
	крестцовые отростки	аномалии	1	4	0.25
			1 и 1 (на разных позвонках)	16	0.98
			2 отростка не на IX позвонке	11	0.67
			3	26	1.59
			4	2	0.12
			всего	59	3.61
		N	1574	96.39	
	число предкрестцовых отростков	отклонения в числе отростков	всего	387	23.7
		N	всего	1246	76.3

ся на 2–3 порядка чаще, чем каждый из остальных его состояний (Коваленко, 2000а).

Наличие ярко выраженной нормы признаков, с одной стороны, ограничивает частоту нормы строения, с другой стороны — ограничивает проявление всех остальных возможных для вида состояний каждого признака в условиях определенного объема тиражирования (плодовитости). Действительно, какова бы ни была плодовитость вида, она конечна. И если есть доминирующий вариант признака (норма), он всегда будет количественно преобладать, а, следовательно, ограничивать возможность проявления остальных вариантов изменчи-

вости. Легко предположить, что чем выше показатель нормы признака, тем меньше возможностей остается на все остальные варианты. И чем больше вариантов изменчивости способен дать вид по данному признаку, тем меньше будет вероятность каждого из них в условиях одной и той же нормы. Этот теоретически ожидаемый результат хорошо подтверждают полученные данные по серой жабе (таблица).

Например, признак “число туловищных позвонков” показывает нормальное состояние (9 позвонков) у 97.49% особей. Соответственно, на варианты изменчивости остается всего 2.51%. А еще

возможно 5 таких вариантов. Соответственно, если они равновероятны, то каждый из них может иметь частоту примерно 0.5%. Но наши данные показывают, что они не равновероятны — их частота варьирует от 0.12 до 0.98%.

Возьмем другой пример — признак “сочленовые отростки на границе туловище—хвост”. Норма по этому признаку у серой жабы составляет 88.8% (нет ни постзигапофизов на IX позвонке, ни презигапофизов на закрестцовом сегменте). На варианты изменчивости остается значительно большая доля — 11.2%, чем в предыдущем случае. Зарегистрировано 6 таких вариантов и, следовательно, каждый из них может иметь большую частоту (теоретически минимум 1.8%, если они равновероятны). Но и они не равновероятны. Часть из них реально показывает вероятность более низкую, чем ожидаемая — 0.87%, а часть существенно более высокую — 4.53%. Но в целом частоты более высокие, чем у вариантов изменчивости предыдущего признака.

Не останавливаясь пока на причинах разных вероятностей реального проявления вариантов изменчивости, можно заключить, что показатель “норма признака” является одним из факторов, ограничивающих реальную изменчивость видов (чем выше норма признаков, тем меньше вероятность проявления других вариантов потенциальной изменчивости). Можно сказать, что “эффект нормы признаков” в совокупности с ограниченной плодовитостью невольно экранирует потенциальное разнообразие вида (скрывает от исследователя полный диапазон изменчивости).

3. Элиминация

Все сказанное выше показывает, что даже в лабораторных условиях реальная изменчивость вида представляет лишь часть потенциальных его возможностей. В природных популяциях в силу вступает еще один фактор — элиминация и избежать ее невозможно. Если вид включен в систему пищевых цепей (а в условиях биосферы иначе и быть не может), то часть его потомков будет неизбежно элиминирована (и безвозвратно утеряна для исследования). Оставшийся диапазон изменчивости будет зависеть от степени элиминации и ее характера. Роль степени элиминации не вызывает разночтений у исследователей. Очевидно, что чем меньше останется потомков, тем меньший диапазон изменчивости будет представлен в их составе. А вот по поводу характера элиминации выдвинуто две альтернативные точки зрения (Коваленко, 2003; Попов, 2005):

1) выборочная (по версии Ч. Дарвина, СТЭ и ее производных);

2) случайная (по версии противников идеи естественного отбора).

Проверить, как отражается выборочная элиминация на диапазоне изменчивости в лабораторных

условиях, не представляется возможным. А вот результаты случайной элиминации можно попробовать предсказать.

Случайная элиминация в условиях “эффекта нормы признаков” и неравной вероятности проявления вариантов изменчивости должна приводить к тому, что в первую очередь из диапазона изменчивости выпадут редкие (малочисленные) варианты. Соответственно, и в реальном разнообразии останется норма и самые высокочастотные варианты изменчивости. Приведенные здесь данные по серой жабе согласуются с этим заключением (таблица). Те варианты аномалий осевого скелета, которые в условиях исключения элиминации имеют самые высокие вероятности в первую очередь и попадают в сферу внимания исследователей, описывающих изменчивость в природных популяциях. Можно сравнить наши данные по серой жабе с теми, что были получены ранее при суммировании собственных и литературных данных по аномалиям позвоночника бесхвостых амфибий (Коваленко, 1992; табл. 6).

Так, синдром НС (нарушение сегментации) и его следствия показали самую высокую для аномалий вероятность в данной серии серой жабы — 6.8%. Ранее было показано, что этот синдром в качестве аномалий характерен для всех позвоночных животных, в том числе и для бесхвостых амфибий (Коваленко, 1992, 2000а). Отдельные аномалии этого синдрома (см. вторую статью этой серии) описаны у целого ряда бесхвостых амфибий, в том числе и у серой жабы (самое раннее описание Adolphi, 1892, 1895).

Хорошо известной аномалией является и слияние тел и/или невральных дуг позвонков у тех видов, для которых в норме оно не характерно. У серой жабы такая аномалия встречается у 2% особей. Но отдельные варианты слияний между позвонками (таблица) имеют частоту от 0.06 до 0.8%. Наибольшую частоту показывает вариант I + II (0.8%). Именно он часто описывается у бесхвостых амфибий из природных популяций, в том числе и у серой жабы. А, кроме того, он встречается и как норма строения у ряда видов Bufonidae (см. Коваленко, 1992, табл. 6.2). Варианты слияний имеющие очень низкую частоту в индивидуальной изменчивости, например, слияние черепа и первого позвонка (0.06% — у серой жабы) ранее у бесхвостых амфибий вообще не были описаны ни разу (см. там же).

Очевидно, что даже случайная элиминация ограничивает изменчивость и в первую очередь за счет редких вариантов строения.

II. Факторы, ограничивающие само число возможных вариантов строения (запреты на определенные сочетания состояний признаков)

Вопрос об ограниченности или неограниченности изменчивости был почвой для острых дис-

	нечетное слияние	свободная половина	всего
шп	34	14	48
без шп		1	1
всего	34	15	49

Рис. 1. Спектр возможных комбинаций состояний признаков “нечетное слияние полупозвонков” и “свободная половина позвонка” (по горизонтали), и “шахматный порядок” (по вертикали). В ячейках указано число экземпляров, у которых встречен данный вариант строения. Остальные обозначения те же, что и в таблице.

куссий между сторонниками разных направлений эволюционного учения, начиная уже с конца XIX в. (Попов, 2005). Например, Н.Я. Данилевский считал, что всякое исследование, устанавливающее факт ограничения изменчивости, опровергает дарвинизм (Данилевский, 1885). Сторонники идеи естественного отбора (дарвинизма, СТЭ и их производных) придерживались представлений о практически неограниченной (или очень большой) изменчивости (см. обзоры Воронцов, 2004; Назаров, 2005; Попов, 2005; Чайковский, 2003; Юнкер, Хоссфельд, 2007 и др.). И это понятно, поскольку в концепции Ч. Дарвина положение о сути выборочной элиминации и положение о неопределенности и неограниченности изменчивости взаимно дополнительные (Коваленко, 2003).

Однако вопрос этот решался в основном на теоретическом уровне, т.к. считалось, что на практике ни доказать, ни опровергнуть представление о характере изменчивости не представляется возможным (см. Коваленко, Попов, 1997). Только в конце XX в. был предложен новый подход к анализу потенциальной изменчивости (Kovalenko, 1994; Kovalenko, 1996). Суть его сводится к анализу реальной изменчивости относительно теоретически ожидаемой, что позволяет выявлять запреты на комбинации между состояниями признаков и в дальнейшем анализировать их возможные морфогенетические причины. Метод был назван “методом спектров” и опробован на ряде признаков посткраниального скелета бесхвостых амфибий (см. Коваленко, 1996б; Коваленко, Данилевская, 1996; Коваленко, Кружкова, 2000; Коваленко, Данилов, 2006б).

То, что состояния отдельных признаков могут быть реализованы как в норме строения у разных видов, так и в составе вариантов их индивидуальной изменчивости, было известно уже во времена Ч. Дарвина. Позднее накопились факты, о том, что наблюдается некоторая закономерность проявле-

ния вариантов изменчивости. На этом наблюдении, по сути, и основана идея “рядов гомологической изменчивости” Н.И. Вавилова (1920). Сам Н.И. Вавилов рассчитывал, что открытый им закон “гомологической изменчивости” будет использован не только в практических целях, но сыграет роль инструмента для оценки биологического разнообразия (Вавилов, 1935). Действительно, обобщение производило впечатление четкого правила. “Этот тип изменчивости [гомологической] ясно демонстрирует, что филум, эволюционируя, заполняет своими видами строки некоторой таблицы, так что оказываются существенно сходными элементы одного столбца” (Любишев, 1982).

Однако, применение “метода спектров” Коваленко показало, что “строки” и “столбцы” теоретически ожидаемой изменчивости у разных видов заполняются не полностью (даже при большом объеме исследованного материала). Было выдвинуто предположение (Коваленко, 1996а, 2000а), что очевидные запреты (или существенные ограничения) на реализацию определенных вариантов строения связаны именно с сочетанием состояний признаков.

Одной из целей данной работы была проверка справедливости сделанных ранее заключений (Коваленко, 2000а): видоспецифичность как нормальных, так и аномальных вариантов строения, определяется не состояниями отдельных признаков, а их комбинациями. Иными словами, потенциальная изменчивость существенно ограничена изначально (еще до того, как любая форма элиминации может ее сократить). Число реальных вариантов индивидуальной изменчивости в группе, изолированной от основных факторов элиминации, существенно ниже того их числа, которое можно было бы ожидать теоретически, если вычислить все сочетания между состояниями интересующих нас признаков.

Ниже мы приводим фактические данные по индивидуальной изменчивости серой жабы в

		свободный X позвонок		несвободный X позвонок		всего
		целый	1/2	целый	1/2	
количество туловищных позвонков	8.0					0
	8.5					0
	9.0	5	1	13	13	32
	9.5		8		2	10
	10.0	4		1		5
всего		9	9	14	15	47

Рис. 2. Спектр возможных комбинаций состояний признаков “наличие закрестцового позвонка” (по горизонтали) и “количество туловищных позвонков” (по вертикали).

	свободный X позвонок		несвободный X позвонок		всего
	целый	1/2	целый	1/2	
НА	2	2	2	5	11
без НА	7	7	12	10	36
всего	9	9	14	15	47

Рис. 3. Спектр возможных комбинаций состояний признаков “наличие закрестцового позвонка” (по горизонтали) и “наличие синдрома нарастающая асимметрия “НА” (по вертикали). Обозначения те же, что и на рис. 1 и в таблице.

	пз IX 2	пз IX л	пз IX пр	пз IX –	всего
прз X 2	14				14
прз X л	5	9			14
прз X пр	6		17		23
прз X –	29	46	57	1450	1582
всего	54	55	74	1450	1633

Рис. 4. Спектр возможных комбинаций состояний признаков “наличие постзигапофизов на IX позвонке” (по горизонтали) и “наличие презигапофизов на X позвонке” (по вертикали). “л” – левая сторона, “пр” – правая сторона, “–” – соответствующий элемент отсутствует. Остальные обозначения те же, что и на рис. 1 и в таблице.

	0 по	1 по	2 по	всего
8.0	5			5
8.5	8	2		10
9.0	1520	61	11	1592
9.5	10	6		16
10.0	7	1		8
дв	2			2
всего	1552	70	11	1633

Рис. 5. Спектр возможных комбинаций состояний признаков “наличие “рудиментарных отростков на уростиле”” (по горизонтали) и “количество туловищных позвонков” (по вертикали). “дв” – другие варианты, “по” – поперечные отростки. Остальные обозначения те же, что и на рис. 1.

	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	ур	всего
без НА		83	1							84
с НА		6	1							7
всего	0	89	2	0	0	0	0	0	0	91

Рис. 6. Спектр возможных комбинаций состояний признаков “бифуркация поперечных отростков” (по горизонтали) и “наличие синдрома “НА” (по вертикали). “ур” – уростиль. Остальные обозначения те же, что и на рис. 1.

пользу этого заключения. Это наглядно представлено на “спектрах изменчивости” по разным признакам (рис. 1–8). Спектры показывают, что состояния разных признаков не свободно комбинируются между собой.

1. Аномалии в составе синдрома “НА” (нарастающая асимметрия)

Корреляции между отдельными признаками особенно хорошо видны примере аномалий в со-

ставе синдрома “нарастающая асимметрия”. Основные из них можно свести в следующие группы (подробное описание см. вторую часть данного сообщения):

– асимметрия в расположении правых и левых закладок позвонков (полупозвонков), которая не приводит к их шахматному порядку;

– шахматный порядок закладок (полупозвонков) на отдельных отрезках осевого скелета;

	II + III 2	II + III л	II + III пр	II – III	всего
биф III 2	20	1	2	2	25
биф III л		21		12	33
биф III пр			37	8	45
биф –				1530	1530
всего	20	22	39	1552	1633

Рис. 7. Спектр возможных комбинаций состояний признаков “слияние II и III поперечных отростков” (по горизонтали) и “бифуркация III поперечного отростка” (по вертикали). “биф” – бифуркация, “–” – нет бифуркации. Остальные обозначения те же, что и на рис. 1, 4 и в таблице.

	220	200	210	120	110	020	011	021	012	002	022	всего
+3												0
+2п		1	1		2	12						16
+2з		2	2	1	3	3						11
+0	2	2		4	6	1548	3	9	2			1576
+0						11	1	5	1	6		24
+2з							1	1				2
всего	2	5	3	5	11	1574	5	15	3	6	0	1629

Рис. 8. Спектр изменчивости двухстороннего крестца *Bufo bufo*. Заштрихованные ячейки с цифрами – реально встреченные варианты; заштрихованные ячейки без цифр – не встреченные, но потенциально возможные варианты; остальные обозначения см. в тексте и на рис. 1.

– слияние нечетного числа закладок (полупозвонков) на отдельных отрезках осевого скелета;

– нечетное число туловищных позвонков.

Анализ показал, что все эти признаки проявляются взаимосвязано. Так шахматный порядок полусегментов позвоночника встречается преимущественно при ярко выраженной нарастающей асимметрии – 46 экз. из 47. Исключение составил 1 экз., у которого наблюдалась локальная асимметрия в крестцовом отделе позвоночника. Нечетное слияние полупозвонков встречается только на фоне их шахматного порядка при нарастающей асимметрии (рис. 1). В свою очередь, признак “свободная половина” какого-либо позвонка явно коррелирует с признаком шахматный порядок в сумме с признаком “слияние нечетного числа закладок” (рис. 1). Единственный экземпляр, который как будто бы выпал из этого правила, на самом деле только подтверждает его. У этого сеголетка разница в длине правых и левых сегментов была не так велика, чтобы шахматный порядок полусегментов сформировался уже в туловищной части (см. подробнее во второй части данного сообщения) и свободной осталась половинка только первого закрестцового сегмента.

Заметим, что перечисленные корреляции в составе синдрома “нарастающей асимметрии” ранее были нами предсказаны и для них выявлены морфогенетические причины (Коваленко, 1983, 1992, 2000а). Ведущим признаком является неравенство сегментов правой и левой стороны. А поскольку сегменты закладываются, начиная с краниального отдела позвоночника, то от того, с какого сегмента эта разница начинается, а также от степени этого неравенства зависит конечный результат развития осевого скелета. Эти условия вводят ограничения на свободное сочетание возможных состояний признаков. Возникает соподчинение признаков –

закономерность, которую называют “законом Кювье” (Воронцов, 2004).

Выше было показано, что одной из аномалий синдрома “НА” является наличие свободного закрестцового позвонка. Однако наш анализ показал, что этот признак не обязательно связан с рассмотренным синдромом.

2. Признак “наличие закрестцового позвонка”

Варианты состояния этого признака и статистика их проявления приведена во второй статье по данной серии (см. вторую часть данного сообщения). Здесь лишь напомним, что закрестцовый сегмент может быть:

1) полностью автономным (свободным – подвижно сочлененным с предыдущим и последующим сегментом);

2) несвободным (неподвижно сочлененным с последним туловищным позвонком и/или с уростилем); но в этом случае он сохраняет следы автономного развития (например, четкую границу с предыдущим и последующим элементом).

Спектр (рис. 2), прежде всего, показывает, что существуют ограничения на сочетание этого признака с признаком “число туловищных позвонков”. Все варианты последнего признака (по вертикали спектра) встречаются в индивидуальной изменчивости серой жабы, но закрестцовый позвонок встречается только в сочетании с 9-ю и большим числом туловищных позвонков. Наибольшую вероятность показывает комбинация 9 туловищных позвонков и “закрестцовый” (32 экз., 2%). Можно было бы предположить, что это есть результат сочетания двух наиболее вероятных состояний признаков (ведь суммарная вероятность равна произведению вероятностей отдельных составляющих). Однако при внимательном рассмотрении видно, что это не так. Например, суммарная вероятность воспроизведения 8 и

8.5 позвонков у серой жабы (15 экз., 0.92%) существенно выше, чем вероятность 10 позвонков (8 экз., 0.49%). И, тем не менее, при первом условии закрестцовый позвонок не встречен ни разу, а при втором встречен у 5 экз. (0.3%), что является довольно высоким показателем для вариантов индивидуальной изменчивости.

Эту закономерность подтверждают и данные по нормальному строению осевого скелета у бесхвостых амфибий (они приведены во второй статье). Закрестцовый позвонок в качестве нормы строения встречается у примитивных *Anura*, имеющих 10 туловищных позвонков (Duellman, Trueb, 1994). А в качестве индивидуальной изменчивости наиболее характерен для представителей археобатрахий (Ritland, 1955; Madej, 1965; Lynch, 1973 и др.), склонных воспроизводить среди вариантов изменчивости большее число туловищных позвонков.

Привлечение к анализу вариантов нецелого числа туловищных позвонков может вызывать заслуженное сомнение — ведь причины таких вариантов связаны с серьезными нарушениями сегментации на ранних стадиях развития (Коваленко, 1983). Поэтому мы провели специальный анализ — насколько связаны между собой признаки “закрестцовый сегмент” и “синдром НА” (нарастающая асимметрия). Однако спектр (рис. 3) показал, что проявление признака “закрестцовый сегмент” не только не зависит от синдрома “НА”, но без него встречается даже чаще (36 экз., 2.2%), чем при его наличии (11 экз., 0.67%).

3. Признак “наличие сочленовных отростков” на границе туловище—хвост

Крестцово-уростильный отдел бесхвостых амфибий показывает наибольшую вариабельность как среди нормальных вариантов строения (в том числе и у *Bufo*idae, Коваленко, Данилов, 2006а, б), так и среди вариантов индивидуальной изменчивости. Целый ряд признаков этого отдела являются диагностическими. Наличие сочленовных отростков на границе туловище — хвост встречается только в составе индивидуальной изменчивости. Этот признак интересен тем, что он, как будто бы, косвенно указывает на автономность развития первого закрестцового сегмента. Количественные данные по его встречаемости приведены во второй статье данной серии. Но кроме этого, нас интересовала корреляция между развитием постзигапофизов крестцового позвонка и презигапофизов закрестцового сегмента.

Спектр (рис. 4) показывает, что из теоретически возможных 16 вариантов реализованы всего 8 вариантов изменчивости и 1 вариант нормы. Остальные ячейки не заполнены, что позволяет предположить запрет на формирование в онтогенезе таких сочетаний (или их очень низкую вероятность — ниже 0.06; т.е. меньше чем 1 экз. на 1633 исследованных). Причем сам характер распо-

ложения “запретов” в спектре показывает, что пропуски в спектре совсем не случайны — формирование сочленовных отростков на последнем туловищном позвонке (IX) и на первом хвостовом (X) явно связаны. Очевидно, что ведущим признаком является наличие постзигапофизов (хотя бы одного) на IX позвонке, т.к. при их отсутствии (последний столбец спектра) презигапофизы на последующих сегментах не встречаются вовсе. А при отсутствии презигапофизов на закрестцовых сегментах (последняя строка спектра) постзигапофизы на IX (крестцовом) позвонке проявляются довольно часто (для вариантов изменчивости).

4. Признак “рудиментарные отростки на уростиле”

В норме строения этот признак встречается у современных и вымерших представителей примитивных семейств (Duellman, Trueb, 1994; Estes, 1977), склонных к формированию увеличенного числа туловищных позвонков. В составе индивидуальной изменчивости он встречается как у представителей продвинутых, так и примитивных семейств, но для последних он более типичен (Коваленко, 1992). Опираясь на эти данные можно было бы ожидать, что рудиментарные поперечные отростки будут коррелировать с увеличением числа туловищных позвонков. Анализ методом спектров (рис. 5) не обнаружил такой явной связи. У серой жабы наибольшую вероятность эта аномалия имеет при девяти туловищных позвонках (72 экз., 4.4%), и существенно более низкую вероятность при увеличенном числе туловищных (9.5 и 10; 7 экз., 0.43%). Такие отростки не запрещены и при уменьшенном числе туловищных позвонков (8 и 8.5; 2 экз., 0.12%), хотя среди нормальных вариантов у *Anura* такое строение не встречается.

5. Признак “слияние позвонков”

Варианты слияния позвонков в условиях синдрома “нарастающая асимметрия” были рассмотрены выше (раздел синдром “НА”). Они в подавляющем большинстве представляют собой объединение нечетного числа полупозвонков в результате общей причины — нарушения порядка положения закладок, которое затрагивает сразу весь позвоночник (или его большую часть). Выше было показано, что аномалии синдрома проявляются коррелятивно.

Здесь остановимся на слияниях, встречающихся в составе индивидуальной изменчивости вне синдрома “НА”. Среди них преимущественно встречается попарное объединение соседних позвоночных сегментов (вторая часть данного сообщения). Причем сливаться могут любые две пары позвонков, а также уростиль с последним туловищным и череп с первым позвонком. У серой жабы практически все они и встречены (кроме пар VI + VII и VII + VIII). Каждый из этих вариантов имеет частоту ниже 1% (десятые и даже со-

тые доли %, таблица) и проявление их явно не связано между собой. Мы не обнаружили ни одного случая совпадения слияния разных пар позвонков в одном позвончике (у одной особи). И это понятно, т.к. вероятность совпадения аномальных состояний двух, независимо варьирующих признаков, равно произведению вероятностей каждого из них. Если мы составим такое произведение даже из двух самых вероятных вариантов слияний (VI + V, 0.37% и VII + IX, 0.18%), то получим вероятность их совпадения, равную 0.066% — т.е. максимум 1 экз. на 1633 исследованных (таблица).

Как не очевидно это заключение, но исходя из представлений о неограниченном характере изменчивости, исследователи нередко легко теоретически достраивают ряды переходных норм с помощью известных аномальных вариантов строения (Коваленко, 2000а). Реконструкция обычно осуществляется путем перекомбинации уже известных состояний признаков. Ее авторы, очевидно, предполагают, что если состояние признака воспроизводится в реальной изменчивости, то вполне может быть реализована и его комбинация с любым другим состоянием второго признака. Но правомочность такого подхода никем не была достаточно аргументирована (Воробьева, Мейен, 1988), а наши данные его существенно дискредитируют (настоящая статья, Коваленко, 2000а).

6. Признаки “бифуркация поперечных отростков” и “слияние дистальных концов поперечных отростков”

Спектр (рис. 6) возможностей проявления бифуркации поперечных отростков у серой жабы показывает, что такое состояние признака встречено только на III и IV позвонках. Вероятность проявления этого состояния составляет 5.57% (91 экз.). Кроме того, видно, что аномалия проявляется как в условиях нормальной сегментации (первая строка спектра), так и в условиях синдрома “НА” (вторая строка спектра). Причем в первом случае вероятность ее реализации существенно выше, чем во втором (5.14% — 84 экз. и 0.43% — 7 экз. соответственно). Учитывая закономерности проявления синдрома “НА”, это не должно вызывать удивления. Первые сегменты исключительно редко попадают под влияние этого синдрома.

Спектр (рис. 6) ясно показывает, что у серой жабы бифуркация дистальных частей поперечных отростков наиболее вероятна для III сегмента позвончика (частота в III сегменте составляет — 5.45% — 89 экз., а в IV — всего 0.12% — 2 экз.). В чем же причина такой специфичности? Поперечные отростки и ребра относятся к группе септальных элементов (Борхвардт, 1982). Коллагеновые волокна септ являются каркасом, на котором скапливается скелетогенная мезенхима, формируя зачатки этих структур. Следовательно, на-

правление роста и форма последних должны во многом зависеть от расположения септальных волокон. Если пучок волокон септы по какой-то причине раздваивается (расщепляется), то и развивающаяся на их основе структура тоже будет раздвояна.

Наиболее вероятной причиной таких локальных нарушений сегментации, на наш взгляд, является наличие какого-то препятствия на пути септы. Случаи раздвоения септ, а соответственно и структур, развивающихся на их основе, встречаются у позвоночных и при нормальном развитии (см. Борхвардт, 1982). Например, у миног межсегментарные сосуды, делят септы на пре- и постсептальные части, в результате чего в одном сегменте тела у этих животных формируется не одна, а две невральные дуги. Позвоночные артерии птиц и млекопитающих разделяют проксимальные участки септальных скоплений мезенхимы на верхние и нижние части. В результате на проксимальных отделах ребер образуются две головки, которыми они причленяются к позвонкам. У птиц большую роль в формировании двухголовчатости ребер играют также стволы симпатической нервной системы (Борхвардт, 1982). Первый хвостовой диапофиз у ящериц “принимает слегка вильчатую форму на своем дистальном крае, обходя тазовое лимфатическое сердце” (Малашичев, 2003, с. 50).

В передних предкрестцовых сегментах *Anura* таким потенциальным и наиболее вероятным препятствием, лежащим на пути септ, является переднее лимфатическое сердце. Оно располагается напротив III миомера, как раз на уровне дистального конца III поперечного отростка, а его каудальный край может доходить до дистального конца IV диапофиза (Кружкова, 2008). Бифуркация именно отростков и встречается в индивидуальной изменчивости у *Bufo bufo*. Для *Anura* характерны 2 пары лимфатических сердец. Но только передняя пара лежит на уровне поперечных отростков, в то время как задняя пара у головастиков находится гораздо ниже (на уровне середины хорды) и не может влиять на развитие диапофизов (Кружкова, 2008). Очевидно, что расположение лимфатического сердца, и определяет высокую вероятность аномалии “бифуркация поперечных отростков” для передних предкрестцовых сегментов.

Если направление одной из септ изменено достаточно сильно, то ее дистальный конец может пересечься с септой соседнего сегмента. Это в свою очередь, с высокой вероятностью приведет к объединению дистальных концов поперечных отростков, развивающихся на их основе. На примере серой жабы видно, что наблюдается корреляция между бифуркацией диапофизов и слиянием их дистальных концов. Выше было показано, что бифуркация наиболее вероятна для поперечных от-

ростков III позвонка (89 экз., 5.3%; рис. 6) и существенно ниже для IV позвонка (2 экз., 0.12%). Самую высокую частоту слияний позвонков за счет объединения поперечных отростков показывает пара II + III (рис. 7). При условии бифуркации, слияние этих двух отростков отмечено у 81 экз. (4.96%), а бифуркация без объединения отростков – всего у 22 экз. (1.35%). Очевидно, что эти события не так жестко связаны между собой, как аномалии синдрома “НА” (см. выше). Бифуркация III поперечного отростка с двух сторон (первая строка спектра) может сопровождаться слиянием соседних отростков только с одной стороны (только с левой или только с правой) или даже не приводить к их слиянию вовсе (2 экз., 0.12%). Кроме того, бифуркация с любой стороны тела коррелирует и со слиянием отростков той же стороны, хотя и не обязательно приводит к этому событию (последний столбец спектра). Но очевидно, что основные состояния признаков (бифуркация по вертикали и слияния по горизонтали) совпадают по частоте реализации, о чем ясно говорит диагональ спектра (рис. 7).

Кроме того, на спектре ясно очерчены ограничения в потенциальном диапазоне изменчивости. Из 16 возможных сочетаний реализованы 8 вариантов изменчивости и 1 вариант нормы. Видно, что ведущим (определяющим) признаком является именно бифуркация поперечного отростка III позвонка. Что и понятно, т.к., во-первых, этот признак формируется в онтогенезе раньше, чем слияние дистальных отделов отростков. А, во-вторых, слияние дистальных концов диапофизов является во многом следствием раздвоения септы, на основе которой и формируется раздвоенный поперечный отросток.

Объединение дистальных концов поперечных отростков представляет собой особый вариант слияния позвонков. Здесь вступают в силу морфогенетические факторы формирования позвоночных сегментов. Свободный позвонок (подвижно сочлененный с соседними позвонками) может сформироваться при условии, что во время развития ничто не препятствует его подвижности относительно предшествующего и последующего позвоночных сегментов. Самыми обычными препятствием для этого является объединение на определенных стадиях онтогенеза зачатков тел и/или невралных дуг (см. все варианты слияний, перечисленные в соответствующем разделе). Но кроме этого, формированию суставов между двумя позвонками может препятствовать и объединение их поперечных отростков, даже если сливаются только их дистальные части. Конечно, такое условие ограничивает подвижность развивающихся позвонков в меньшей степени, уже потому, что в ходе онтогенеза дистальные части диапофизов

формируются относительно поздно (Кружкова, 2008).

7. Увеличение числа крестцовых диапофизов

Выше было показано (вторая часть данного сообщения), что в индивидуальной изменчивости бесхвостых амфибий число крестцовых диапофизов может как сокращаться (до 1 или 0), так и увеличиваться (до 3-х или 4-х). Здесь рассмотрим варианты увеличения числа крестцовых диапофизов (варианты двухстороннего крестца). Для анализа таких вариантов строения крестца у Апуга ранее (Коваленко, 1996а, 2000а) был построен спектр, который учитывает комбинации возможных состояний семи признаков крестцового отдела (в скобках указаны состояния признака, возможные для серой жабы):

- 1) число туловищных позвонков (3 состояния – 8, 9, 10);
- 2) число позвонков, несущих крестцовые диапофизы (2 состояния – 1, 2);
- 3) общее число крестцовых диапофизов (3 состояния – 2, 3, 4);
- 4) наличие свободного закрестцового позвонка (2 состояния – нет, да);
- 5) слияние крестцового позвонка с предкрестцовым (2 состояния – нет, да);
- 6) слияние крестцового позвонка с уростилем (2 состояния – нет, да);
- 7) слияние крестцового позвонка со свободным закрестцовым (2 состояния – нет, да).

В спектре (рис. 8) комбинации первых трех признаков расположены по горизонтали. По вертикали в верхней части спектра (четыре верхние строки) расположены комбинации, в которых свободный закрестцовый сегмент не участвует. В нижней части спектра (две нижние строки) – комбинации участием свободного закрестцового сегмента. Обозначения строк спектра:

- “+0” – слияний между элементами нет;
- “+2з” – слиты два задних элемента (крестцовый и соответствующий закрестцовый);
- “+2п” – слиты два передних элемента (крестцовый и предкрестцовый);
- “+3” – слиты все три элемента (предкрестцовый, крестцовый и закрестцовый).

Спектр показывает, что дополнительные крестцовые диапофизы могут формироваться либо на предкрестцовом позвоночном сегменте (VIII позвонке – левая часть спектра), либо на закрестцовом (уростиле или автономном X позвонке – правая часть спектра). И это первое ограничение на варианты изменчивости для всех бесхвостых амфибий (Коваленко, 1996а, 2000а) – дополнительные крестцовые отростки не формируются одно-

временно и на предкрестцовых, и на закрестцовых сегментах.

Сетка спектра очерчивает те комбинации, которые входят в диапазон потенциальных возможностей отряда — 46 вариантов. Из этого числа в индивидуальной изменчивости серой жабы реально встречены всего 24 варианта (заполненные ячейки спектра, Sr — спектр реальной изменчивости). Допустим, что часть вариантов не встречена в реальной изменчивости из-за их низкой частоты, но потенциально они могут быть обнаружены, скажем, при увеличении выборки. Это пропуски в не полностью заполненных строках и столбцах (в спектре такие ячейки закрашены, но в них нет цифр). Вместе с реальными вариантами строения они образуют спектр потенциальной изменчивости (Sp) данного вида и он объединяет 32 варианта строения крестцового-уростильного отдела из 46 возможных для отряда.

Остальные варианты либо запрещены для этого вида, либо имеют исключительно низкую вероятность реализации. Такие комбинации легко определяется методом спектров — это полностью незаполненные строки или столбцы. Для серой жабы это верхняя строка левой части спектра, верхняя строка и последний столбец правой части спектра (всего 14 вариантов). Таким образом, под запретом оказываются все варианты строения, в которых:

- слиты предкрестцовый, крестцовый и закрестцовые сегменты (строка “+3”);
- слиты крестцовый и закрестцовый сегменты при условии формирования крестцовых отростков на закрестцовых сегментах (строка “+2з” правой части);
- имеется два крестцовых отростка на IX позвонке и два — на закрестцовом сегменте.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Одной из задач данной работы являлась — дать представление об общем характере индивидуальной изменчивости, ее закономерностях и ограничениях (если таковые найдутся) в группе не подвергнутой естественной элиминации. Иными словами, речь идет о потенциальных возможностях изменчивости вила. А именно этот показатель является решающим в споре о роли естественного отбора (из какого диапазона изменчивости выбирает отбор?). Так, виды, потерявшие способность к рекомбинации, рассматриваются как не способные к дальнейшей эволюции, “тупиковые” (Гребельный, 2008), т.к. возможности их изменчивости фактически сводятся к минимуму. Но это заключение будет верно только в том случае, если объем изменчивости зависит исключительно от потенциала генетической информации. Приведенные в

данной статье фактические данные позволяют усомниться в этом предположении.

Суммируя полученные результаты, мы можем сформулировать несколько тезисов в пользу представлений об изначальном ограничении изменчивости (до того, как она будет подвергнута любой форме элиминации) на примере осевого скелета бесхвостых амфибий.

1. Состояния признаков в большинстве случаев не свободно комбинируются между собой.

Даже если учесть только те состояния признаков, которые встречены в реальной изменчивости данного вида, то спектр, составленный из их комбинаций реализуется не полностью (рис. 1–8).

2. Среди ограничений на теоретически возможные комбинации можно выделить две основные группы:

а) вероятность совпадения состояний двух (и более) независимо варьирующих признаков, каждый из которых имеет низкую вероятность реализации;

вероятность их совпадения равна произведению их вероятностей;

б) зависимо варьирующие признаки; коррелятивные отношения между формирующимися в ходе онтогенеза структурами.

3. В диапазоне индивидуальной изменчивости ни один признак не показывает 100% частоту нормы при выборке определенного для данного вида объема.

Объем выборки диктуется вероятностью реализации того состояния признака, который мы хотим зарегистрировать.

4. Диапазон индивидуальной изменчивости явно мал для того, чтобы соответствовать представлению о “неограниченной изменчивости”, из которой естественный отбор при необходимости черпает новые варианты строения.

Если “правило” неограниченности изменчивости имеется, то оно должно проследиваться в изменчивости любого вида, поскольку это условие считается основным для дальнейшей перспективы вида — его эволюции.

Фактические данные о корреляциях между формированием признаков в онтогенезе мы приводили и ранее (Коваленко, 2000а; Коваленко, Кружкова, 2000; Кружкова, 2008). Здесь мы хотели еще раз подчеркнуть, что в данной статье высказанные ранее предположения о существовании онтогенетических запретов (областях ограничений в общем спектре) существенно подкреплены количественными данными, полученными в лаборатории при сведении к минимуму естественной элиминации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Борхвардт В.Г.* Морфогенез и эволюция осевого скелета. Л.: Изд-во ЛГУ, 1982. 144 с.
- Вавилов Н.И.* Закон гомологических рядов в наследственной изменчивости. Саратов, 1920. Цит. по: Закон гомологических рядов в наследственной изменчивости. Л.: Наука, 1987. С. 10–22.
- Вавилов Н.И.* Закон гомологических рядов в наследственной изменчивости. М.; Л., 1935. Цит. по: Закон гомологических рядов в наследственной изменчивости. Л.: Наука, 1987. С. 56–100.
- Воробьева Э.И., Мейен С.В.* Морфологические исследования в палеонтологии // Современная палеонтология. М.: Недра, 1988. Т. 1. С. 80–122.
- Воронцов Н.Н.* Развитие эволюционных идей в биологии. М.: КМК, 2004. 432 с.
- Гребельный С.Д.* Клонирование в природе: роль останковки генетической рекомбинации в формировании фауны и флоры. СПб.: Зоологический институт РАН, 2008. 283 с.
- Данилевский Н.Я.* Дарвинизм. Критическое исследование. Т. 1. СПб., 1885. Ч. I. XII. 519 с.; Ч. 2. XVI. 530. 148 с.
- Коваленко Е.Е.* Коррелятивные изменения в позвоночнике травяной лягушки *Rana temporaria* // Зоол. журн. 1983. Т. 62. Вып. 4. С. 564–569.
- Коваленко Е.Е.* Аномалии позвоночника бесхвостых амфибий. СПб., 1992. С. 1–142.
- Коваленко Е.Е.* Анализ изменчивости крестца Anura. 1. Метод анализа изменчивости крестца бесхвостых амфибий // Зоол. Журн. 1996а. Т. 75. Вып. 1. С. 52–66.
- Коваленко Е.Е.* Анализ изменчивости крестца Anura. 2. Изменчивости крестца у представителей рода *Rana* // Зоол. Журн. 1996б. Т. 75. Вып. 2. С. 222–236.
- Коваленко Е.Е.* Изменчивость посткраниального скелета бесхвостых амфибий: Автореф. дис. докт. биол. наук. СПб.: ЗАО “Познание”, 2000а. 117 с.
- Коваленко Е.Е.* Массовые аномалии конечностей у бесхвостых амфибий // Журн. общ. биол. 2000б. Т. 61. № 4. С. 412–427.
- Коваленко Е.Е.* Альтернатива концепции Ч. Дарвина // В тени дарвинизма. Альтернативные теории эволюции в XX веке. 2003. С. 192–217.
- Коваленко Е.Е., Данилевская С.Э.* Аномалии передних конечностей у лабораторных шпорцевых лягушек (*Xenopus laevis*) // Зоологический журнал. 1996. Т. 75. Вып. 6. С. 907–916.
- Коваленко Е.Е., Данилов И.Г.* Разнообразие крестцово-уростильного отдела в семействе Bufonidae (Amphibia, Anura). 1. Фактическое разнообразие крестца у буфонид // Зоол. Журн. 2006а. Т. 85. № 4. С. 500–516.
- Коваленко Е.Е., Данилов И.Г.* Разнообразие крестцово-уростильного отдела в семействе Bufonidae (Amphibia, Anura). 2. Анализ разнообразия методом спектров // Зоологический журнал. 2006б. Т. 85. № 6. С. 725–740.
- Коваленко Е.Е., Кружкова Ю.И.* Аномалии задних конечностей у лабораторной шпорцевой лягушки *Xenopus laevis* (Anura, Pipidae). 2. Коррелятивные изменения таза и задних конечностей // Вестн. СПбГУ. 2000. Сер. 3. Вып. 3. № 19. С. 9–24.
- Коваленко Е.Е., Попов И.Ю.* Новый подход к анализу свойств изменчивости // Журн. общ. биол. 1997. № 1. С. 70–83.
- Кружкова Ю.И.* Строение, развитие и изменчивость крестцово-тазового комплекса бесхвостых амфибий (Amphibia, Anura). Дис. канд. биол. наук. СПб. 2008. С. 1–249.
- Любичев А.А.* Проблемы формы, систематики и эволюции организмов. М.: Наука, 1982. 278 с.
- Малашичев Е.Б.* Строение и развитие крестцово-тазового комплекса амниот. Дис. канд. биол. наук. СПб. 2003. 244 с.
- Назаров В.И.* Эволюция не по Дарвину: смена эволюционной модели. М.: КомКнига, 2005. 520 с.
- Попов Ю.И.* Ортогенез против дарвинизма. Историко-научный анализ концепций направленной эволюции. СПб.: Изд-во СПб. ун-та, 2005. 207 с.
- Раутиан А.С., Раутиан Г.С.* Морфологическое обоснование гомологических рядов в наследственной изменчивости (на примере хроматических аббераций тетеревиных) // Журн. Общ. Биол. 1985. Т. 46. № 3. С. 375–388.
- Чайковский Ю.В.* Эволюция. “Ценологические исследования”. Вып. 22. М.: Центр системных исследований – ИИЕТ РАН, 2003. 472 с.
- Юнкер Т., Хоссфельд У.* Открытие эволюции: Революционная теория и ее история. Под ред. Г. С. Левита. СПб.: Изд-во СПб. ун-та, 2007. 219 с.
- Duellman W.E., Trueb L.* Biology of amphibians. Baltimore–London: The Johns Hopkins University Press, 1994. 670 p.
- Estes R.* Relationships of the South African fossils frog *Eoaxenopoides reuningi* (Anura, Pipidae) // Ann. Sauth. Afr. Mus. 1977. V. 73. № 2. P. 49–80.
- Kovalenko E.E.* The variability of anuran sacrum: structure analysis in the whole spectrum of its possibility // ICVM-4 Abstracts. J. Morphol. 1994. V. 220. № 3. P. 362.
- Lynch J.D.* The transition from archaic to advanced frogs. P. 133–182. In: Evolutionary biology of the anurans: contemporary research on major problems. Ed. by Vial J.L., University of Missouri Press: Columbia, 1973.
- Madej Z.* Variations in the sacral region of the spine in *Bombina bombina* (Linnaeus, 1758) and *Bombina variegata* (Linnaeus, 1758) (Salientia, Discoglossidae) // Acta Biol. Cracoviensia. 1965. V. 8. № 2. P. 185–197.
- Ritland R.M.* Studies on the post-cranial morphology of *Ascaphus truei*. I. Skeleton and spinal nerves // J. Morphol. 1955. V. 97. № 1. P. 119–177.

Individual Variation in the Development of the Common Toad, *Bufo bufo* (Anura, Bufonidae): 3. Limitations of Individual Variation and Their Causes

E. E. Kovalenko^a and Yu. I. Kruzhkova^b

^a*St. Petersburg State University, Universitetskaya nab. 7/9, St. Petersburg, 199034 Russia*

^b*Herzen State Pedagogical University, nab. reki Moiki 48, St. Petersburg, 191186 Russia*

e-mail: kovalenko_i@mail.ru

Abstract—The results of studies on the axial skeleton of the common toad (a model species) have been used to analyze factual limitations of individual variations. The results show that the states of the studied characters do not freely combine with each other but are subject to certain morphogenetic limitations. The causes of most these limitations have been revealed during the study. Classification of the main factors limiting individual variation in the course of development is presented.

Keywords: *Bufo bufo*, postcranial skeleton, individual variation, morphogenetic limitations.

УДК 581.432

НАЧАЛЬНЫЕ ЭТАПЫ РАЗВИТИЯ КОРНЕВЫХ СИСТЕМ У ТРЕХ ВИДОВ НЕДОТРОГ *IMPATIENS* (BALSAMINACEAE)

© 2013 г. М. В. Марков, В. З. Юсуфова

Московский педагогический государственный университет

119991 Москва, ул. Малая Пироговская, д. 1, стр. 1

E-mail: markovsmail@gmail.com

Поступила в редакцию 27.12.12 г.

Окончательный вариант получен 01.02.13 г.

Показано своеобразие развития морфологической и анатомической структуры корневой системы у проростков трех видов недотрог на самых ранних и следующих за ними этапах онтогенеза. Обсуждается соответствие выявленной структуры экологическому своеобразию видов, в особенности у аборигенного вида недотроги обыкновенной, у которой аллоризию можно выявить лишь на анатомическом уровне.

Ключевые слова: структура зародыша, ранний онтогенез, аллоризия, гоморизия, главный, боковые, придаточные корни.

DOI: 10.7868/S0475145013040071

ВВЕДЕНИЕ

Еще совсем недавно ботаники, занимающиеся происхождением и основными эволюционно значимыми признаками цветковых растений, интересовались только эволюцией цветков, плодов, листьев и стеблей, почти не уделяя внимания корням. Видя причину такой ситуации отчасти в скрытости корней от глаз в почве или под водой и их меньшей внешней эффектности, Чарльз Хеймш (Heimsch, Seago, 2008), тем не менее, отметил, что корни могут обеспечить исследователя набором признаков весьма важных для познания эволюции и филогении наземных растений. В процитированной выше большой обзорной статье, посвященной организации апикальной меристемы корня (далее АМК) у цветковых (затронуто 45 порядков и 132 семейства) авторы, являясь представителями авторитетной научной школы, пришли в результате обобщения к выводу о некотором преобладании по числу семейств с исключительно закрытым типом АМК над семействами с исключительно открытым типом. При этом они отметили, что многие семейства включают представителей с АМК обоих названных типов и что предковыми, вероятно, следует считать АМК открытого типа, т.е. без четко выраженных слоев и границ между эпидермисом, кортексом, корневым чехликом и даже без инициалей стели. В отноше-

нии экологической обстановки, в которой могли эволюционировать ранние цветковые и их корни, авторы обзора, со ссылкой на коллег палеоботаников (Field et al., 2004; Friis, 2004) называют либо водоемы, получающие полный солнечный свет, или затененные и притом нарушенные местообитания на влажных почвах (“dark and disturbed” habitats in moist soil). Отсюда логичным выглядит предположение авторов о большом значении для этих ранних (базальных) цветковых вегетативного размножения, сопряженного с формированием придаточных корней. Особое внимание предлагается обратить на корни *Cabomba*, что, по мнению авторов обзора, может обеспечить наилучшее уяснение происхождения, развития, структуры и функций АМК. Нельзя не отметить, что многое из того, что представлено в обзоре, было намечено и, отчасти, осуществлено в статьях Н.С. Воронина (1964) и Н.В. Воронкиной (1974, 1975), на которые ссылаются авторы обзора. Уже в этих статьях было проиллюстрировано большое разнообразие анатомической структуры корней и высказаны мысли относительно примитивности открытых (как у голосеменных) и продвинутой закрытых типов. Следует подчеркнуть при этом целесообразность изучения онтогенетической динамики развития корня с установлением соотношения аллоризии-гоморизии, чтобы всегда из текста было понятно,

анатомическое строение какого именно корня из всей корневой системы проанализировано. Так, например, в обобщающей таблице обзора Хеймша на основании данных о строении первичного (главного) корня (primary root) характерным для семейства Balsaminaceae назван только один тип (HTD – Tiered or closed euDicot with Hypodermis) строения АМК – слоистый или закрытый тип с гиподермой, характерный для собственно двудольных (eudicots). Такая информация представляется далеко не полной, если обратиться к углубленному изучению развития корней в онтогенезе у отдельных видов семейства Balsaminaceae, представители которого фигурируют не только среди аборигенных видов флоры России (недотрога обыкновенная *Impatiens noli-tangere*), но и среди агрессивных заносных видов – адвентиков (н. мелкоцветковая и н. железконосная *I. parviflora* и *I. glandulifera*), даже попавших в Черную книгу флоры Средней России (Виноградова и др., 2009). Экологическое своеобразие этих незимующих однолетников (по сравнению с другими однолетними растениями) состоит, кстати, в способности произрастать в уже упомянутых выше затененных нарушенных местообитаниях на почвах повышенной влажности. Сложившийся в науке стереотип, априори приписывающий всем однолетникам ярко выраженную аллоризию и ведущий свое начало от автора этого понятия Карла Гебеля (Groff, Kaplan, 1988), уже не раз приводил к появлению досадных ошибочных не только описаний, но даже изображений однолетних растений и, в том числе, недотрог (см. например, Губанов и др., 2003).

Цель настоящей статьи – исследовать своеобразие развития морфологической и анатомической структуры корневой системы у проростков трех видов недотрог на самых ранних и следующих за ними этапах онтогенеза, коррелирующее с их экологическим своеобразием.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА

Семена и начальные этапы активной части онтогенеза трех названных видов недотрог были изучены в лабораторных условиях, но на материале, собранном в природных лесных популяциях, с осени маркированных для последующего отыскания при еще не сошедшем снежном покрове. Дело в том, что необходимая для нормального прорастания семян холодовая стратификация наилучшим образом проходит на поверхности почвы (или близко к ней) именно под снегом, где оптимальным образом сочетаются требуемые температура и влажность. К концу зимы (последняя декада февраля и первая декада марта) семена бывают на

100% готовы к немедленному прорастанию при переносе в лабораторию – в условия более высокой температуры (~20°C).

Взятые из-под снега семена, а их размеры и четкие отличительные признаки позволяли это, были немедленно выделены из субстрата (отделены от подстилки и почвы) и помещены на фильтровальную бумагу в чашки Петри для проращивания. Первые этапы сразу же начинавшегося прорастания были сфотографированы под бинокулярной лупой цифровой камерой Nikon L22, а чуть позже у проростков, ювенильных и молодых вегетативных особей гипокотиль, переходная зона и корневая система были анатомированы, при помощи замораживающего микротомы или от руки, и после окрашивания временных препаратов поперечных и продольных срезов флороглюцином с HCl зарисованы и сфотографированы той же камерой. Полученные цветные фотографии позволили выявить локализацию в проростках и ювенилах антоциана, а также четко распознать ткани из клеток с одревесневшими стенками и даже типы сосудов в первичной и вторичной ксилеме.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Прямой зародыш в покоящихся семенах недотрог обыкновенной и мелкоцветковой уже под семенной кожурой имеет несколько расширенную и закругленную корневую часть (рис. 1а и 2а). На этом расширении или вздутии нижней части гипокотили, которое не получило в отечественной литературе никакого названия, а в англоязычной обозначено термином “collet” (Hartmann et al., 2010) – в это время не удастся разглядеть ни одной инициальной зоны предстоящего в скором будущем корнеобразования.

На самых начальных этапах прорастания семян (рис. 2а–2в и 4а, 4б) хорошо видно, что у недотрог железконосной и мелкоцветковой с момента наклеивания семени сразу выделяется отходящий от этой несколько расширенной нижней части гипокотили главный корень, чего нельзя сказать о проростке н. обыкновенной (рис. 1а–1е). Яркообразно расширенная нижняя часть гипокотили (collet) у последнего вида поначалу, у наклюнувшегося семени, как и у других, абсолютно круглая, но после формирования окрашенных антоцианом бугорков инициалей “выпускает” сразу до 12 одинаковых корней. Развиваться эти корни могут не всегда абсолютно синхронно, но ни один из них не выделяется и потому не может быть признан главным.

Четыре боковых корня как у н. мелкоцветковой, так и у н. железконосной, подобно главному,

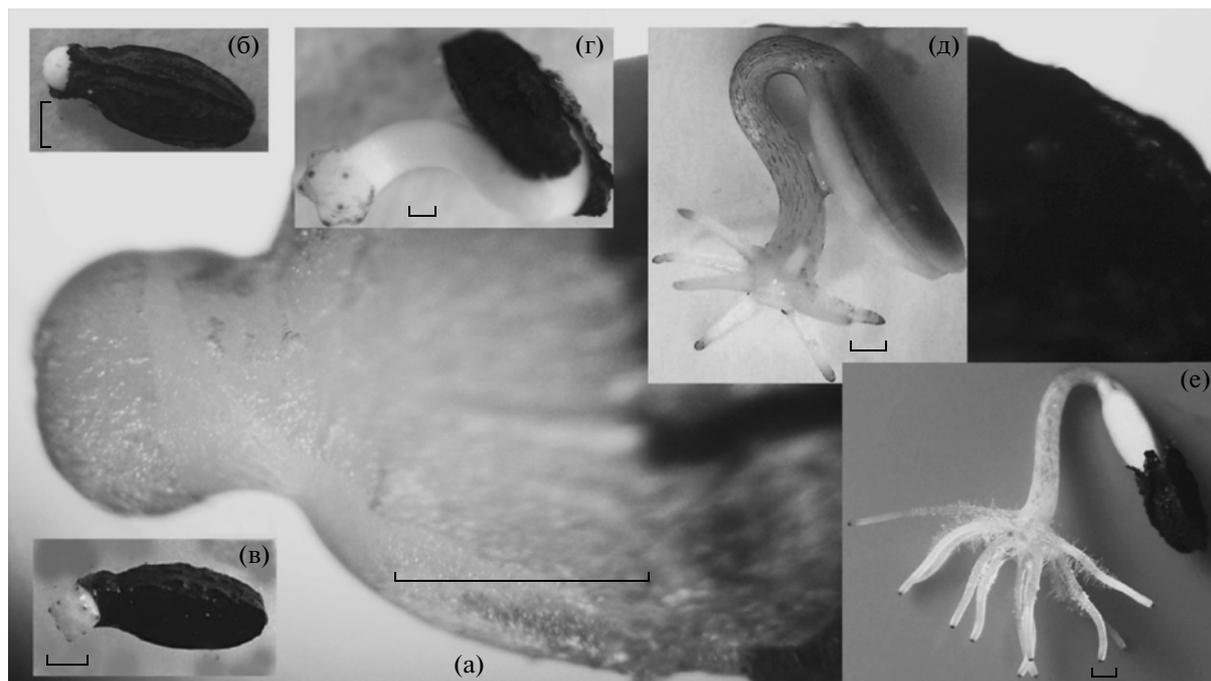


Рис. 1. Строение корневой части прямого зародыша семени (а) и динамика заложения окрашенных антоцианом инициалей (б, в, г) и синхронного формирования боковых корней, отходящих от якорсообразного расширения (collet) в основании гипокотиля (д, е) с трихальными зонами (е) у недотроги обыкновенной. Здесь, как и на всех других фото, длина любого масштабного штриха – 1 мм.

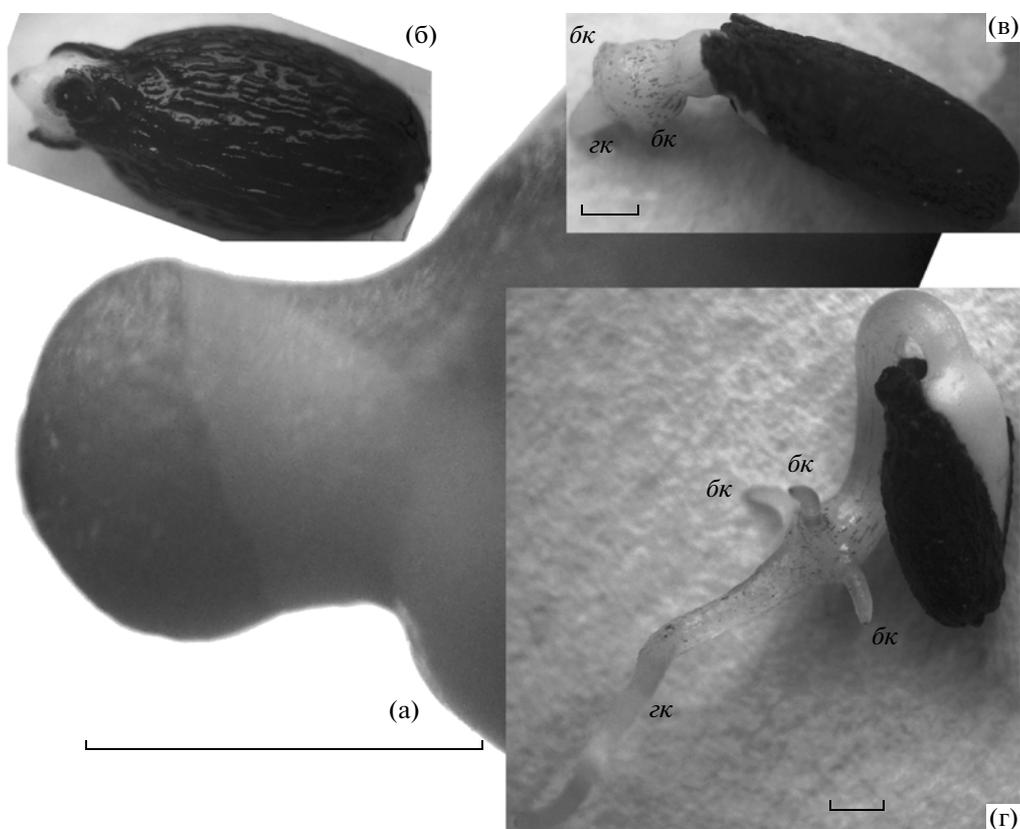


Рис. 2. Строение корневой части прямого зародыша семени (а), наклонувшееся семя с инициалью главного корня (б), формирование главного (гк) и боковых (бк) корней (в, г) у недотроги мелкоцветковой.

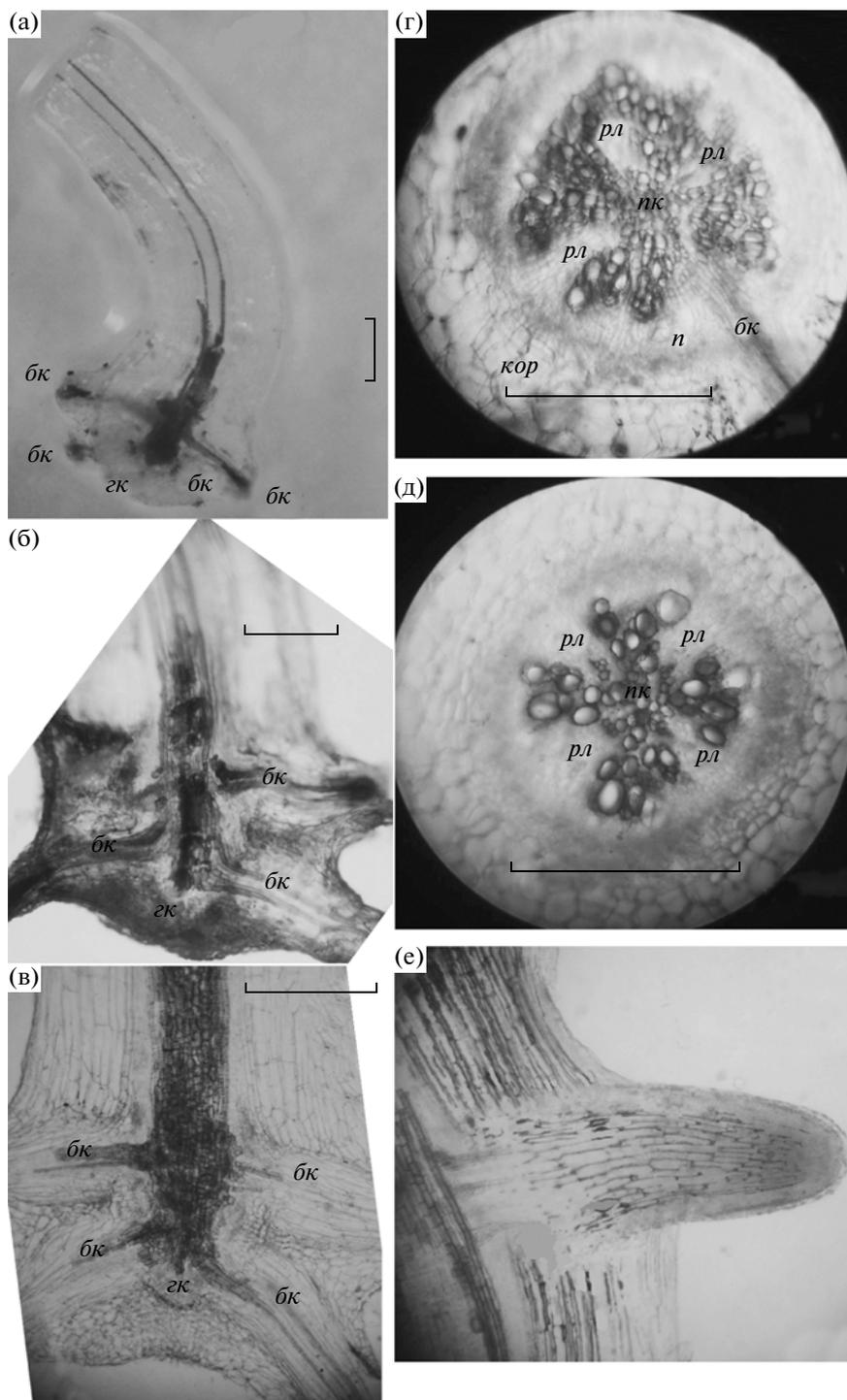


Рис. 3. Продольные (а–в – представленные в разных масштабах) и поперечные (г, д) срезы якореобразного расширения в основании гипокотиля проростков (collet) недотроги обыкновенной, обработанные для окрашивания лигнифицированных тканей, и придаточный корень в начале его формирования (е). *гк* – главный и *бк* – боковые корни; *пк* – первичная ксилема; *рл* – радиальные лучи паренхимы, разделяющие массивы вторичной ксилемы; *кор* – кортекс; *п* – перицикл.

несут корневые чехлики, окрашенные антоцианом (на черно-белых рис. 2а и 2в – это видно по более темным кончикам корней). Окрашены антоциа-

ном, помимо наружных клеток гипокотиля, и кончики всех корней, отходящих от якореобразно расширенной нижней части гипокотиля проростка н.

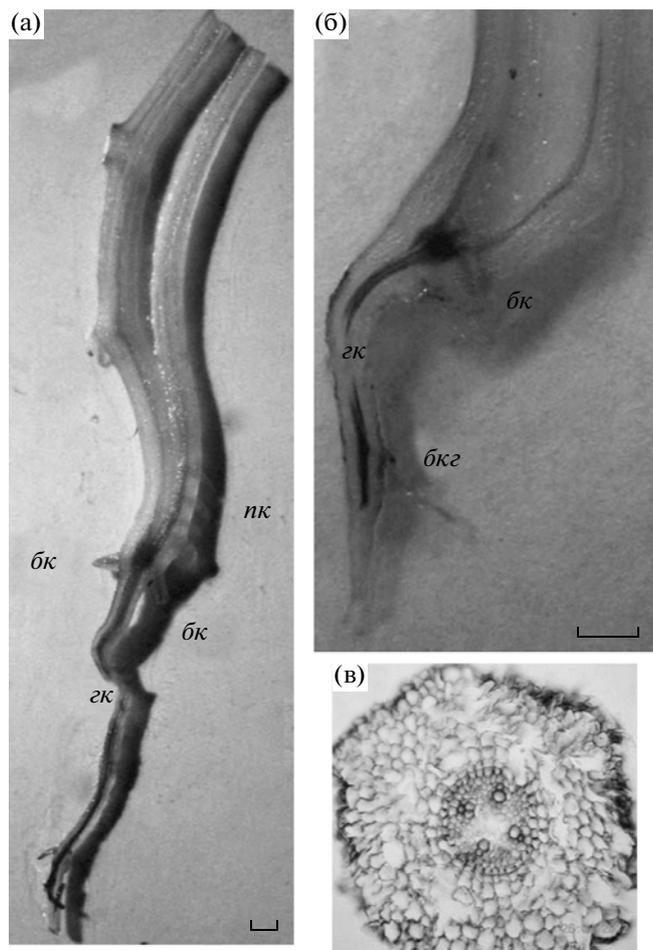


Рис. 4. Продольные срезы через вздутое основание гипокотыля (collet) у проростка недотроги железконосной (а) и мелкоцветковой (б). Поперечный срез главного корня н. железконосной (в). Ход пучков виден благодаря окрашиванию лигнифицированных тканей. *гк* — главный корень; *бк* — боковые корни; *бкг* — боковой корень, отходящий от главного; *пк* — придаточные корни.

обыкновенной (см. рис. 1а–1е). При этом каждый из них в ходе роста формирует зону корневых волосков (трихальную зону), что особенно хорошо заметно на рис. 1е.

Природу всех упомянутых выше корней проростков недотрог можно выявить, только анатомировав от руки или при помощи микротомы нижнюю расширенную часть гипокотыля и применяя классическую микрохимическую реакцию на одревеснение — окрашивая срезы флороглюцином в кислой среде. Названная процедура позволяет проиллюстрировать ксилемную часть (преимущественно из сосудов с одревесневшими стенками) зоны проведения микрофотографиями. Даже на черно-белых фотографиях хорошо виден ход прово-

дящих пучков, который позволяет констатировать полную остановку роста главного корня (*гк*) у н. обыкновенной, далеко зашедшую дифференцировку проводящей сосудистой ткани, а также, уже на поперечных срезах, завершившийся вторичный рост: 4 массива вторичной ксилемы, расположенные между лучами тетраархной первичной ксилемы, разделены паренхимой радиальных лучей (*рл*), а от участков перицикла, расположенного против протоксилемы отходят боковые (!) корни (рис. 3а–3д).

На продольных срезах нижней части гипокотылей недотрог мелкоцветковой и железконосной (рис. 4а, 4б) можно хорошо видеть радиальные пучки главных корней (*гк*), тетраархная структура которого у н. железконосной представлена и на поперечном разрезе (рис. 4в). На продольном срезе гипокотыля н. железконосной (рис. 4а) можно также видеть вертикальный ряд (ортостиху) заложившихся придаточных корней (*пк*). Придаточные корни закладываются, таким образом, выше расширенной части гипокотыля — там, где кончается переходная зона, а радиальный пучок главного корня разделяется на расположенные по кругу вокруг выполненной или разрушившейся сердцевинки (эустелически) коллатеральные пучки.

В гипокотыле сразу по выходе его на поверхность почвы медулярный (за счет сердцевинки) рост усиления приводит к формированию заметного у всех особей вздутия, от которого отходят расположенные упорядоченно придаточные корни (рис. 3е).

ОБСУЖДЕНИЕ

Исследований, затрагивающих морфологию и анатомию семян и проростков недотрог с учетом формирования корневых систем, в литературе нами встречено очень мало. В обстоятельной статье Изабель МакКлатчи (McClatchi, 1917) приведены рисунки проростков н. железконосной, причем не только представлены разные варианты, связанные с прорастанием на разной глубине, но и обсуждается частота встречаемости некоторых вариантов. Схематические рисунки прорастающего семени и проростка с корневой системой на ранних этапах, фигурировавшие в статье из цикла “Флора Британских островов”, посвященной н. мелкоцветковой (Soombe, 1956), были воспроизведены в отечественном издании “Сравнительная анатомия семян”. В комментарии к ним сказано, что хорошо развитые дополнительные корни опережают в развитии первичный зародышевый корешок, но пояснения относительно того, какова природа этих

т.н. дополнительных корней не дано. Татэми Шимицу (Shimizu, 1982) использовал разнообразие морфологии проростков для подразделения видов недотроги, произрастающих в Тайланде, на 2 группы (с надземным и подземным прорастанием) и 10 подгрупп, которые различаются соотношением длины гипо- и эпикотила, листорасположением. Статья Шимицу, полагающего, что морфология проростков имеет таксономическую значимость, иллюстрирована фотографиями, качество которых в полиграфическом исполнении оставляет желать лучшего. Именно поэтому особенности подземных органов, как мало интересовавших исследователя, рассмотреть в деталях не представляется возможным. Позднее Нанду и Шимицу (Nandu, Shimizu, 2005) опубликовали и классификацию недотрог по изученным с помощью сканирующего электронного микроскопа морфологическим особенностям семенной кожуры, отнеся н. обыкновенную к секции *Brachycentron*, а н. железконосную — к секции *Microcentron*, но структуру зародышевой семян они не рассматривали.

Автор еще одной статьи из цикла “Флора Британских островов”, посвященной н. обыкновенной, П. Хатчер (Hatcher, 2003) представил крайне схематичные и непонятные рисунки корневых систем, а из описания неведомо, как идет их развитие на ранних этапах.

По нашим данным у н. обыкновенной мы наблюдаем детерминированный крайне непродолжительный рост главного корня на самых ранних этапах активного онтогенеза.

Детерминированный рост корня представляет уникальный путь развития, когда меристематические клетки делятся только короткое ограниченное время, после чего претерпевают дифференциацию. Подобный тип роста был описан у некоторых птеридофитов, у кукурузы, у ряда представителей сем. *Cactaceae*: опунции песчаной и у стеноцереуса (Dubrovsky, 1997), а также в некоторых других семействах (Dinkelaker et al., 1995).

Особенности наших объектов состоят не только в очень ранней остановке роста главного корня, который у н. обыкновенной вообще морфологически даже не выделяется, но быстром переходе ко вторичному росту, быстрой дифференцировке вторичных проводящих тканей и очень раннем ветвлении — образовании боковых (а не придаточных,

как можно было бы думать о корнях, отходящих от вздутного основания гипокотыля!) корней. Здесь для доказательства фактической аллоризии и чрезвычайно раннего перехода ко вторичной гоморизии мы сталкиваемся с необходимостью проведения анатомического исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Виноградова В.К., Майоров С.П., Хорун Л.В. Черная книга флоры Средней России. М.: ГЕОС, 2009. 501 с.
- Воронин Н.С. Эволюция первичных структур в корнях растений // Уч. Зап. Калужского пед. ин-та. 1964. № 13. С. 14–20.
- Воронкина Н.В. Анатомическое строение апекса корня *Nymphaeales* J. Schaffner // Бот. Журнал. 1974. Т. 59. № 10. С. 1417–1424.
- Воронкина Н.В. Гистогенез в апексах корней покрытосемянных растений и возможные пути его эволюции // Бот. Журнал. 1975. Т. 60. № 2. С. 170–187.
- Губанов И.А., Киселева К.В., Новиков В.С., Тихомиров В.Н. Иллюстрированный определитель растений Средней России М.: КМК, 2003. Т. 2. 665 с.
- Coombe D.E. *Impatiens parviflora* DC // Journ. of Ecology. 1956. V. 44. № 2. P. 701–713.
- Dinkelaker B., Hengeler C., Marschner H. Distribution and function of proteoid roots and other root clusters // Botanica Acta. 1995. V. 108. № 1. P. 183–200.
- Dubrovsky J.G. Determinate primary-root growth in seedlings of Sonoran Desert Cactaceae; its organization, cellular basis, and ecological significance // Planta. 1997. V. 203. № 1. P. 85–92.
- Field T.S., Arens N.C., Doyle J.A., Dawson T.E., Donoghue M.J. Dark and disturbed: a new image of early angiosperm ecology // Paleobiology. 2004. V. 30. P. 82–107.
- Friis E.M., Pedersen K.R., Crane P.R. Araceae from the early Cretaceous of Portugal: evidence on the emergence of monocotyledons // Proceedings of the National Academy of Science, USA. 2004. 101. P. 16565–16570.
- Groff P.A., Kaplan D.R. The relation of root systems to shoot systems in vascular plants // The Botanical Review. 1988. V. 54. № 4. P. 388–422.
- Hartmann H.T., Kester D.E., Davies F.T., Geneve R.L. Hartmann and Kester's plant propagation: Principles and Practices. 8th Edition. Prentice Hall, 2010. 928 p.
- Hatcher P.E. *Impatiens noli-tangere* L. // Journal of Ecology. 2003. V. 91. № 1. P. 147–167.
- Nanda U., Shimizu T. Seed morphology and classification of *Impatiens* (Balsaminaceae) // Blumea. 2005. V. 50. P. 447–456.
- Shimizu T. Seedling morphology in some Thai *Impatiens* and its taxonomic significance // J. Fac. Lib. Arts, Shinsu Univ., Nat. Science. 1982. № 16. P. 85–97.

Initial Stages of the Root System Development in Three *Impatiens* Species (Balsaminaceae Family)

M. V. Markov and V. Z. Yusufova

Moscow State Pedagogical University, ul. Malaya Pirogovskaya 1, bld. 1, Moscow, 119991 Russia
e-mail: markovsmail@gmail.com

Abstract—Peculiarities of the development of morphological and anatomical structures of the root system have been studied in the seedlings of three *Impatiens* species at the early and subsequent stages of their ontogenesis. Correspondence between the revealed structure and the ecological originality of species, especially in the case of the aboriginal touch-me-not balsam, whose allorhizy can be revealed only at the anatomical level, is discussed.

Keywords: embryo structure, early ontogenesis, allorhizy, homorhizy, main, lateral, and additional roots.

УДК 591.3:597.5

РОЛЬ ОВОДНЕНИЯ В ОВУЛЯЦИИ ООЦИТОВ ТРАВЯНОЙ ЛЯГУШКИ *IN VITRO*

© 2013 г. М. Н. Скоблина

Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН

119334 Москва, ул. Вавилова, д. 26

E-mail: skoblina38@mail.ru

Поступила в редакцию 23.03.12 г.

Окончательный вариант получен 21.11.12 г.

В процессе стимуляции овуляции ооцитов травяной лягушки *Rana temporaria* экстрактом гомологичных гипофизов происходит увеличение их объема. Воздействия, подавляющие оводнение ооцитов костистых рыб (раствор Рингера без ионов калия и ингибитор Na^+ , K^+ -АТФазы — оубаин), а также ингибиторы аквапоринов (хлористая ртуть и метилметанетиосульфат) приводят к тому, что объем окруженных фолликулярными оболочками ооцитов травяной лягушки под влиянием экстракта гомологичных гипофизов не увеличивается, а процент овулировавших ооцитов снижается. Объем ооцитов, лишенных фолликулярных оболочек, не меняется при созревании под действием прогестерона, на него не влияет ни одна из использованных обработок. Полученные данные позволяют предполагать, что в процессе стимуляции овуляции ооцитов травяной лягушки происходит их оводнение, необходимое для овуляции, оно не происходит в отсутствие клеток фолликулярной оболочки.

Ключевые слова: ооцит, фолликул, созревание, овуляция, оводнение, аквапорины, оубаин, хлористая ртуть, метилметанетиосульфат, амфибии.

DOI: 10.7868/S0475145013030075

Для превращения овариального ооцита в способное к оплодотворению яйцо необходимо, чтобы он созрел (произошла дезинтеграция оболочки ядра — “зародышевого пузырька” (ЗП), прошли деления созревания, “созрела” цитоплазма) и овулировал, т.е. освободился от оболочек, окружавших его в яичнике.

У ряда видов амфибий и костистых рыб механизм гормональной регуляции процессов созревания довольно хорошо изучен. Показано, что под влиянием гонадотропных гормонов гипофиза в фолликулярных клетках, окружающих ооцит, синтезируется стероид, который, действуя на ооцит, запускает процессы созревания (Masui, Clarke, 1979; Nagahama, 1990). Для видов, используемых в лаборатории, известны условия, в которых ооцит созревает *in vitro* под влиянием гонадотропинов или стероидов. Однако воспроизведение *in vitro* процесса овуляции сталкивается с большими трудностями. Созревшие *in vitro* ооциты зачастую не овулируют.

Созревание ооцитов костистых рыб сопровождается увеличением объема ооцита, вызванным оводнением. Оводнение рассматривается как процесс, обеспечивающий достаточную плавучесть выметанной икре, особенно пелагической (Wal-

lace, Selman, 1978; Cerda et al., 2007). Однако есть данные и об оводнении ооцитов морских рыб, откладывающих донную икру (Craik, Harvey, 1987), и пресноводных рыб (Hirose, 1976). С одной стороны, считается, что оводнение ооцитов костистых рыб в процессе созревания является уникальным явлением среди позвоночных (Wallace, Selman, 1978; Cerda et al., 2007), с другой — высказывается предположение о том, что оводнение ооцитов может играть роль в механизме овуляции (Hirose, 1976; Milla et al., 2006). Если предположение о роли оводнения в овуляции ооцитов справедливо, возникает вопрос, не является ли процесс оводнения ооцитов более универсальным, чем это принято считать, не может ли он участвовать в механизме овуляции ооцитов не только у костистых рыб, но и у других низших позвоночных? В литературе есть данные об увеличении объема (Mild, Lovtrup, 1985) и веса овулировавших ооцитов травяной лягушки (Руднева, 1968, цитировано по Детлаф, 1977), но предположений о связи этого процесса с овуляцией не высказывается. Если для овуляции ооцитов низших позвоночных действительно необходимо оводнение, то не может ли отсутствие овуляции при ее стимуляции *in vitro* быть связано с нарушением этого процесса?

Хиро́зе (Hirose, 1976) предположил, что в механизме оводнения ооцитов костистых рыб существенную роль играет поступление в ооцит неорганических ионов. В пользу этого предположения свидетельствуют данные о том, что оводнение ооцитов подавляется воздействиями, препятствующими их накоплению: средой, не содержащей ионы калия (Wallace et al., 1992), и подавлением Na^+ - K^+ -АТФазы и натриевых каналов (LaFleur, Thomas, 1991). Установлено также, что оводнение ооцитов фундулуса обыкновенного (*Fundulus heteroclitus*) (McPherson et al., 1989) и японского речного угря (*Anguilla japonica*) (Kagawa et al., 2009) не происходит в отсутствие фолликулярных клеток. В последнее время показано, что в оводнении ооцитов костистых рыб участвуют аквапориновые водные каналы (АП), обеспечивающие пассивное поступление воды в клетку по осмотическому градиенту (Arge et al., 2002). Их участие в оводнении ооцитов обнаружено у дорады (*Sparus auratus*) (Fabra et al., 2005, 2006), японского речного угря (Kagawa et al., 2009) и пресноводного обыкновенного мешкожаберного сома (*Heteropneustes fossilis*) (Chaube et al., 2011). Их проницаемость, как и проницаемость большинства водных каналов, подавляется соединениями ртути и частично восстанавливается β -меркаптоэтанолом (Fabra et al., 2005; Kagawa et al., 2009; Chaube et al., 2011).

Мы хотели выяснить, происходит ли увеличение объема в процессе созревания и овуляции ооцитов травяной лягушки *in vitro*, и, если происходит, влияют ли на него воздействия, подавляющие оводнение ооцитов костистых рыб (среда без ионов K^+ , подавление Na^+ - K^+ -АТФазы, подавление аквапоринов). Для решения вопроса о том, играет ли увеличение объема какую-то роль в овуляции, мы сравнивали их влияние не только на объем ооцитов, но и на процент ооцитов, овулировавших под влиянием экстракта гомологичных гипофизов.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Опыты были проведены на фолликулах травяной лягушки *Rana temporaria* на протяжении трех сезонов, нумерация самок сплошная (первый сезон: самки 1–14, второй: самки 15–27, третий: самки: 28–31). Отловленных осенью самок содержали в контейнере с небольшим количеством воды в темноте при 4°C. Самок забивали декапитацией после выдерживания в 0.2% растворе MS-222. Яичники переносили в раствор Рингера для холоднокровных и разделяли отточенными пинцетами на фрагменты, содержащие 1–5 фолликулов. Фрагменты тщательно перемешивали и переносили в чашки Петри с 5 мл раствора (по 33 фолликула на чашку). Фолликулы выдерживали в растворе Рингера (контроль) или в растворе ингибитора в течение 2 ч. Затем и в опыт и контроль добавляли

экстракт гипофизов травяной лягушки (до конечной концентрации 0.005–0.0025 гип/мл). В опытах по изучению влияния ингибиторов водных каналов фолликулы после преинкубации в растворе Рингера с ингибиторами отмывали в трех сменах раствора Рингера (по 10 мл) и помещали в раствор Рингера с прогестероном (1 мкг/мл). В ряде случаев фолликулы инкубировали в растворе Рингера с прогестероном или экстрактом гипофизов в течение разного времени (см. табл. 5), затем обрабатывали хлористой ртутью, отмывали и переносили в раствор Рингера с прогестероном. Для стимуляции овуляции в опытах с хлористой ртутью через сутки добавляли простагландин $\text{F}_{2\alpha}$ (2.5 мкг/мл).

Фолликулы инкубировали при 15–17°C, созревание и овуляцию ооцитов регистрировали через 48 ч после начала гормональной обработки. Каждый вариант опыта ставили в двух–четыре повторения. Критерием овуляции служило отсутствие на ооцитах фолликулярной оболочки, хорошо выявляемое под бинокулярным микроскопом. После учета овуляции ооциты фиксировали кипячением, разрезали лезвием безопасной бритвы и определяли процент созревших ооцитов по отсутствию ЗП.

Фолликулярные оболочки удаляли пинцетами после обработки фрагментов яичника бескальциевым раствором Рингера. Режим обработки фолликулов бескальциевым раствором Рингера и проверка полноты удаления фолликулярных клеток подробно описаны ранее (Скоблина, Кондратьева, 1983). В каждом варианте опыта в чашке Петри с 5 мл раствора культивировали по 15–20 “голых” ооцитов. Для стимуляции их созревания использовали прогестерон (1 мкг/мл).

При определении процента овуляции для различных экспериментальных групп рассчитывали среднюю и ошибку средней. Для оценки достоверности различий ($p < 0.05$) использовали критерий χ^2 для качественных показателей.

Измерение ооцитов и фолликулов обычно проводили через двое суток после начала гормональной обработки. Диаметры измеряли на их изображениях, полученных с помощью сканирования. В большинстве опытов сканировали 3–4 пробы в каждом варианте опыта и контроля на сканере Epson Perfection 4490 Photo. Была использована специальная компьютерная программа, которая обеспечивает автоматическое измерение двух диаметров ооцитов (наибольшего и перпендикулярного к нему) на изображениях, полученных для каждого экспериментального варианта, расчет объема каждого ооцита и определение среднего значения. Статистическую обработку полученных результатов проводили, используя непараметрическую статистику – критерий Манна–Уитни–Уилкоксона для независимых выборок в программе SigmaPlot.

Таблица 1. Сравнение объемов исходных и овулировавших ооцитов

Дата опыта	Номер самки	Объем, мм ³ ($M \pm m$)		Разница в объеме исходных фолликулов и овулировавших ооцитов, %
		исходных фолликулов	овулировавших ооцитов	
03/01	1	3.11 ± 0.15 (32)	3.21 ± 0.13 (34)***	3.2
14/02	2	1.81 ± 0.11 (51)	1.86 ± 0.09 (31)*	2.8
14/02	3	2.16 ± 0.18 (24)	2.36 ± 0.14 (31)***	8.5
21/02	4	2.27 ± 0.22 (68)	2.36 ± 0.09 (46)**	3.9
22/02	5	1.69 ± 0.05 (25)	1.77 ± 0.10 (99)*	4.5
04/03	6	2.00 ± 0.15 (97)	2.05 ± 0.13 (119)	2.1
14/03	7	1.89 ± 0.10 (83)	1.95 ± 0.01 (122)***	3.0
18/03	8	1.73 ± 0.09 (83)	1.76 ± 0.09 (46)	1.8
29/03	9	1.18 ± 0.06 (148)	1.23 ± 0.06 (186)***	4.3
29/03	10	1.62 ± 0.09 (154)	1.69 ± 0.07 (202)***	3.4
29/3	11	1.60 ± 0.09 (61)	1.69 ± 0.06 (38)***	3.8
05/04	12	2.05 ± 0.09 (50)	2.13 ± 0.12 (97)***	3.7
11/04	13	2.09 ± 0.11 (71)	2.21 ± 0.09 (79)***	5.5
18/04	14	2.07 ± 0.12 (95)	2.13 ± 0.096 (82)**	2.9

Здесь и далее в скобках приведено число измерений. Здесь и далее * $P < 0.05$, ** < 0.01 , *** < 0.001 .

РЕЗУЛЬТАТЫ

Изменение объема ооцитов на разных стадиях созревания

Измерения, проведенные на фолликулах 14 самок лягушки, показали, что объем исходных и созревших под влиянием экстракта гипофизов или прогестерона, но не овулировавших ооцитов не меняется (данные не приведены). Небольшие (2.8–8.5%), но достоверные увеличения объема наблюдаются у большинства овулировавших ооцитов (табл. 1). В двух случаях различия между исходными и овулировавшими ооцитами оказались недостоверным (самки 6 и 8).

Влияние ионов калия и $Na^+ - K^+ - ATP$ азы на овуляцию ооцитов, стимулированную экстрактом гипофизов, и на объем ооцитов

Результаты опытов по влиянию раствора Рингера без ионов калия на овуляцию ооцитов травяной лягушки, стимулированную экстрактом гипофизов, и на объем ооцитов приведены в табл. 2. Можно видеть, что у всех пяти самок отсутствие в растворе ионов калия приводит к достоверному снижению объема ооцитов по сравнению с объемом ооцитов, овулировавших в контроле, и к достоверному уменьшению процента овулировавших ооцитов.

Результаты опытов по влиянию оубаина на овуляцию ооцитов травяной лягушки, стимулированную экстрактом гипофизов, и на объем ооцитов сведены в табл. 3. Оубаин также достоверно снижает объем ооцитов по сравнению с объемом

ооцитов, овулировавших в контроле, и достоверно подавляет стимулированную овуляцию у всех восьми самок.

Влияние ингибиторов аквапоринов (хлористой ртути и метилметанетиосульфоната) на овуляцию ооцитов травяной лягушки, индуцированную прогестероном и простагландином $F_{2\alpha}$, и на объем ооцитов

В первых опытах мы использовали хлористую ртуть в концентрации 100 мкМ–1 мМ. Такая обработка сильно повреждала фолликулы. Дальнейшие опыты показали, что фолликулы разных самок травяной лягушки обладают разной чувствительностью к хлористой ртути. В табл. 4 приведены данные о влиянии разных концентраций хлористой ртути на объем фолликулов шести самок. Обработку 100 мкМ (10 мин) выдержала часть фолликулов двух самок (16 и 30), все фолликулы остальных самок при такой обработке погибли. Часть фолликулов пяти самок выдержала обработку 50 мкМ хлористой ртути (20 мин), обработку от 20 до 40 мкМ хлористой ртути (25 мин) выдержали фолликулы всех самок, но достоверное снижение объема достигалось не во всех случаях. Снижение объема фолликулов не зависело от концентрации хлористой ртути. На фолликулах дорады (Fabra et al., 2005) и японского речного угря (Kagawa et al., 2009) показано, что обработка фолликулов β-меркаптоэтанолом (1–5 мМ) сразу же после обработки хлористой ртутью в той или иной мере восстанавливает их объем. В наших опытах объем фоллику-

Таблица 2. Влияние раствора Рингера без ионов калия на процент ооцитов травяной лягушки, овулировавших под влиянием экстракта гипофизов, и на объем ооцитов/фолликулов

Дата опыта	Номер самки	Объем, мм ³ ($M \pm m$)		Овулировавшие ооциты, %	
		ооцитов, овулировавших в контроле	ооцитов/фолликулов в опыте	в контроле	в опыте
3/01	1	3.21 ± 0.13 (34)	3.09 ± 0.14 (33)***	71 ± 6	12 ± 5*
3/01	28	3.18 ± 0.16 (29)	2.95 ± 0.22 (32)***	35 ± 3	11 ± 2*
15/01	29	2.25 ± 0.12 (64)	2.10 ± 0.14 (79)***	43 ± 0	15 ± 2*
14/02	2	1.86 ± 0.09 (31)	1.72 ± 0.10 (27)***	52 ± 5	16.5 ± 3.5*
04/03	6	2.04 ± 0.13 (147)	1.89 ± 0.14 (155)***	36.5 ± 1.5	12.5 ± 4.5*

Здесь и далее созревание в контроле и опыте 98–100%.

Таблица 3. Влияние оубаина в концентрации 0.05 мМ на процент ооцитов травяной лягушки, овулировавших под влиянием экстракта гипофизов, и на объем ооцитов/фолликулов

Дата опыта	Номер самки	Объем, мм ³ ($M \pm m$)		Овулировавшие ооциты, %	
		ооцитов, овулировавших в контроле	ооцитов/фолликулов в опыте	в контроле	в опыте
14/02	2	1.86 ± 0.09 (31)	1.76 ± 0.09 (61)***	56 ± 3.5	5 ± 2*
14/02	3	2.36 ± 0.14 (31)	2.18 ± 0.17 (28)***	82 ± 5	10 ± 3*
22/02	6	2.04 ± 0.13 (147)	1.95 ± 0.13 (161)***	37 ± 2	0*
14/03	7	1.95 ± 0.10 (122)	1.82 ± 0.11 (142)***	64 ± 6	22 ± 5*
18/03	8	1.76 ± 0.09 (46)	1.69 ± 0.11 (56)**	47 ± 8	9 ± 3*
29/03	9	1.23 ± 0.06 (186)	1.14 ± 0.08 (136)***	78 ± 5	22 ± 4*
29/03	10	1.68 ± 0.07 (202)	1.57 ± 0.11 (65)***	85 ± 2	57 ± 4*
05/04	12	2.13 ± 0.12 (97)	2.05 ± 0.13 (66)***	57 ± 4	7 ± 2*

Таблица 4. Влияние концентрации хлористой ртути на объем созревших ооцитов, окруженных фолликулярными оболочками

Дата опыта	Номер самки	Объем ооцитов в контроле, мм ³ ($M \pm m$)	Объем ооцитов, мм ³ ($M \pm m$) после обработки ртутью в концентрации				
			20 мкМ	30 мкМ	40 мкМ	50 мкМ	100 мкМ
30/01	15	2.68 ± 0.18 (63)	2.52 ± 0.14 (54)***	2.50 ± 0.10 (39)***		2.52 ± 0.13 (35)***	
09/02	16	2.28 ± 0.11 (90)		2.25 ± 0.12 (71)	2.24 ± 0.12 (49)	2.21 ± 0.10 (40)***	2.17 ± 0.26 (31)***
09/02	17	1.66 ± 0.09 (32)	1.62 ± 0.05 (32)*	1.54 ± 0.12 (11)**		1.50 ± 0.07 (17)**	
09/02	30	2.33 ± 0.13 (83)		2.24 ± 0.10 (39)***	2.21 ± 0.10 (41)***	2.15 ± 0.09 (32)***	2.16 ± 0.09 (26)***
14/02	18	2.38 ± 0.18 (29)		2.31 ± 0.15 (29)	2.26 ± 0.18 (30)*	2.26 ± 0.13 (22)**	
07/04	27	1.56 ± 0.08 (61)		1.54 ± 0.10 (54)	1.53 ± 0.09 (54)*		

Достоверность указана по отношению к контролю.

лов двух самок травяной лягушки достоверно увеличивался под влиянием 15-минутной обработки β -меркаптоэтанолом (5 мМ) сразу же после их обработки хлористой ртутью (30 мкМ). Однако β -меркаптоэтанол в отсутствие хлористой ртути тоже достоверно увеличивал объем фолликулов (данные не приведены). Кроме того, фолликулы, обработанные β -меркаптоэтанолом, как после обработки ртутью, так и без нее, повреждались. У японского речного угря отмечено снижение процента созревания ооцитов на 90% после обработки фолликулов хлористой ртутью и β -меркаптоэтанолом (1 мМ) (Kagawa et al., 2009).

Окруженные фолликулярными оболочками ооциты травяной лягушки, обработанные хлористой ртутью, не созревали под влиянием экстракта гипофизов. Прогестерон стимулировал созревание выживших ооцитов всех самок при всех использованных обработках. Фолликулы с созревшими ооцитами выглядели неповрежденными в течение двух суток (времени, необходимого для овуляции *in vitro* ооцитов травяной лягушки в период зимовки), но овуляция не происходила, а в контроле овулировали единичные ооциты. Поскольку под влиянием прогестерона ооциты травяной лягушки плохо овулируют, а простагландин $F_{2\alpha}$ увеличивает стимулирующее действие стероида (Скоблина и др., 1996), к фолликулам в опыте и контроле добавляли простагландин $F_{2\alpha}$.

Кроме того, опыты проводили в самом конце периода зимовки и обрабатывали ртутью не только фолликулы на исходной стадии, но и предварительно обработанные прогестероном или экстрактом гипофизов, чтобы ингибитор действовал на наиболее подготовленные к овуляции фолликулы и ооциты.

Опыты проведены на фолликулах пяти самок. Их результаты сведены в табл. 5. Можно видеть, что в большинстве случаев хлористая ртуть вызывает и снижение объема ооцитов по сравнению с объемом ооцитов, овулировавших в контроле, и подавление овуляции, стимулированной прогестероном и простагландином $F_{2\alpha}$. Однако есть и исключения. В двух случаях (самка 21 — обработка 30 мкМ хлористой ртути после 15 ч предобработки экстрактом гипофизов (0.0025 гип/мл) и самка 26 — обработка 10 мкМ хлористой ртути после 8.5 ч предобработки прогестероном) различия в объеме ооцитов оказались недостоверными, а различия в проценте овулировавших ооцитов — достоверными. Возможно, в этих случаях фолликулярные клетки оказались более чувствительными к повреждающему действию ртути. Чем объясняется противоположный результат — отсутствие подавления овуляции ооцитов при достоверном снижении объема фолликулов (обработка хлористой ртутью (30 мкМ) фолликулов самки 27 после 6 ч их предобработки прогестероном) — сказать трудно. Возможно, снижения объема ооцита (хоть

оно и достоверно по сравнению с объемом овулировавших ооцитов) недостаточно для подавления овуляции. Можно видеть также, что даже при использовании предварительной гормональной обработки только к концу периода зимовки из обработанных хлористой ртутью фолликулов овулируют единичные ооциты. Позднее хлористая ртуть (20 и 30 мкМ) уже не влияет ни на объем фолликулов, ни на овуляцию ооцитов (самка 27).

В качестве другого ингибитора водных каналов мы использовали не содержащий ртути сульфгидрильный реагент — метилметанетиосульфат (ММТС) (Kurbannazarova et al., 2003; Kida et al., 2005), который не оказывает на клетки такого повреждающего влияния, как хлористая ртуть.

Опыты по влиянию ММТС на изменение объема и овуляцию ооцитов лягушки, стимулированную прогестероном, проведены на фолликулах трех самок (табл. 6). (В этих опытах простагландин $F_{2\alpha}$ не использован.) Оказалось, что ни одна из концентраций ММТС (от 10 мкМ до 1 мМ) при продолжительности обработки от 1 ч до суток внешне не повреждала фолликулы. В концентрации 1 мМ ММТС во всех случаях подавлял созревание ооцитов, в концентрации 450 мкМ ооциты созревали, но не овулировали. В концентрациях от 10 до 150 мкМ, часть ооцитов овулировала. При обработке фолликулов 10 мкМ ММТС в течение 1–2 ч у всех самок не наблюдалось ни снижения объема ооцитов, ни подавления овуляции. Достоверное снижение объема ооцитов по сравнению с объемом ооцитов, овулировавших в контроле, и подавление овуляции наблюдалось при использовании ММТС в концентрациях 50 и 150 мкМ (2 ч) и 10 мкМ (12 ч). Видно, что достоверному снижению объема фолликулов под влиянием ММТС соответствует снижение процента овулировавших ооцитов. Исключение составляет обработка 50 мкМ ММТС фолликулов самок 20 и 23. Объем фолликулов в этих случаях менялся достоверно, а процент овуляции — недостоверно. Возможная причина такого расхождения результатов обсуждалась выше.

Стоит отметить, что ММТС повреждает фолликулы меньше, чем хлористая ртуть, поскольку овуляция ооцитов происходит без предварительной гормональной обработки фолликулов и без добавления в среду простагландина $F_{2\alpha}$.

Роль фолликулярных оболочек в оводнении ооцитов

Ооциты травяной лягушки после удаления фолликулярных оболочек созревают в растворе Рингера с прогестероном, их объем не отличается достоверно от объема фолликулов на исходной стадии и не изменяется при созревании. Он не меняется и при инкубации в растворе Рингера без ионов калия или в растворе Рингера с оубаином

Таблица 5. Влияние хлористой ртути на объем ооцитов/фолликулов и процент ооцитов, овулировавших под влиянием прогестерона и простагландина F_{2α}

Дата опыта	Номер самки	Концентрация HgCl ₂ , мкМ	Время предобработки гормоном (ЭГ, прог) до начала обработки HgCl ₂ , часы	Объем, мм ³ (<i>M</i> ± <i>m</i>)		Овулировавшие ооциты, %		
				ооцита/фолликула в контроле	ооцита/фолликула в опыте	в контроле	в опыте	
14/03	21	30	0	2.36 ± 0.10 (68)	2.24 ± 0.11 (45)***	8.5 ± 2.5	0*	
			ЭГ 0.0025	2.38 ± 0.09 (35)	2.29 ± 0.06(28)***	15.5 ± 0.5	0*	
			12					
			ЭГ 0.0025 15	2.40 ± 0.10 (34)	2.36 ± 0.07(34)	33.5 ± 3.5	0*	
22/03	24	30	0	1.52 ± 0.08 (100)	1.42 ± 0.06 (61)***	26.5 ± 6.5	0*	
			ЭГ 0.00125	1.52 ± 0.07 (31)	1.45 ± 0.05 (35)***	33 ± 0	0*	
			3					
			ЭГ 0.00125 12	1.51 ± 0.06 (36)	1.46 ± 0.07 (33)***	35 ± 2	0*	
22/03	25	30	0	2.43 ± 0.09 (134)	2.29 ± 0.14 (63)***	43 ± 5	0*	
			ЭГ 0.00125	2.44 ± 0.09 (68)	2.31 ± 0.06(65)***	43 ± 5	0*	
			3					
			ЭГ 0.00125 12	2.44 ± 0.09 (68)	2.20 ± 0.21(35)***	65 ± 2	0*	
04/04	26	10	0	1.64 ± 0.07 (54)	1.59 ± 0.08 (47)***	40.5 ± 12.5	0*	
			0	1.64 ± 0.07 (54)	1.55 ± 0.07 (48)***	40.5 ± 12.5	0*	
			0	1.64 ± 0.07 (54)	повреждены	40.5 ± 12.5	повреждены	
			10	прог. 8.5	1.64 ± 0.07 (56)	1.63 ± 0.01 (59)	54 ± 1.5	14 ± 0*
			20	прог. 8.5	1.64 ± 0.07 (56)	1.56 ± 0.08 (59)***	54 ± 1.5	1.5 ± 1.5*
			30	прог. 8.5	1.64 ± 0.07 (56)	1.53 ± 0.07 (56)***	54 ± 1.5	0*
07/04	27	30	0	1.63 ± 0.07 (82)	1.56 ± 0.09 (59)**	35 ± 5	14 ± 4*	
			20	прог. 3	1.63 ± 0.07 (77)	1.60 ± 0.08 (56)	35.5 ± 3.5	40 ± 3
			30	прог. 3	1.63 ± 0.07 (77)	1.56 ± 0.09 (56)**	35.5 ± 3.5	1.5 ± 1.5*
			20	прог. 6	1.63 ± 0.07 (83)	1.61 ± 0.07 (80)	35.5 ± 3.5	30 ± 10
			30	прог. 6	1.63 ± 0.07 (83)	1.58 ± 0.07 (60)***	35.5 ± 3.5	41.5 ± 1.5
			20	прог. 9	1.63 ± 0.07 (78)	1.60 ± 0.08 (53)	35.5 ± 3.5	33.5 ± 3.5
			30	прог. 9	1.63 ± 0.07 (78)	1.60 ± 0.08 (53)	35.5 ± 3.5	35 ± 2

ЭГ – экстракт гипофиза – гип/мл, прог – прогестерон – 1 мкг/мл.

(0.05 мМ) как в присутствии, так и в отсутствие прогестерона (данные не приведены).

Влияние хлористой ртути и MMTS на объем ооцитов без фолликулярных оболочек

В опытах с хлористой ртутью использованы ооциты без фолликулярных оболочек четырех самок. Ооциты оказались более чувствительными к хлористой ртути, чем фолликулы. Неповрежденные “голые” ооциты, созревшие после обработки хлористой ртутью, удалось получить только при использовании концентраций от 10 до 20 мкМ

(25 мин). Однако объем таких ооцитов или не отличался достоверно от объема созревших в прогестероне ооцитов, или увеличивался. Увеличение концентрации ртути приводило к более выраженному разбуханию ооцита, а затем и к его повреждению (данные не приведены).

Поскольку ранее было показано, что при использовании хлористой ртути в концентрациях 0.3–10 мкМ достоверное снижение объема ооцитов шпорцевой лягушки наблюдается при обработке 1 мкМ (Virkki et al., 2002), мы обработали ооциты четырех самок травяной лягушки хлористой ртутью в концентрации 0.1, 0.5, 1, и 5 мкМ.

Таблица 6. Влияние метилметанесульфоната (ММТС) на овуляцию ооцитов травяной лягушки, стимулированную прогестероном, и объем ооцитов/фолликулов

Дата опыта	Номер самки	Концентрация ММТС, мкМ	Объем, мм ³ ($M \pm m$)		Овулировавшие ооциты, %	
			ооцитов, овулировавших в контроле	ооцитов/фолликулов в опыте	в контроле	в опыте
22/02	19	10	2.21 ± 0.12 (62)	2.17 ± 0.11 (58)	34.5 ± 2.5	36.5 ± 6.5
		10	2.21 ± 0.12 (62)	2.12 ± 0.10 (29)**	34.5 ± 2.5	19.5 ± 1.5*
07/03	20	50	2.25 ± 0.12 (62)	2.19 ± 0.13 (29)*	29 ± 3	19.5 ± 6.5
		150	2.25 ± 0.12 (62)	2.18 ± 0.10 (31)**	23 ± 9	0*
18/03	23	50	2.38 ± 0.09 (59)	2.29 ± 0.06 (28)***	23 ± 9	14.5 ± 7.5
		150	2.38 ± 0.09 (59)	2.26 ± 0.08 (31)***	23 ± 9	0*

Объем ооцитов измеряли до обработки ртутью, непосредственно после нее и через сутки после обработки. Ни одна из использованных концентраций не привела к достоверному снижению объема ооцита (данные не приведены).

Влияние ММТС на лишённые фолликулярных оболочек ооциты травяной лягушки исследовано на трех самках. Обработка ММТС в концентрации 50 и 150 мкМ в течение 2 ч внешне не повредила ооциты и не влияла на их созревание, объем ооцитов не изменялся. Увеличение концентрации ММТС приводило к повреждению ооцитов (данные не приведены).

ОБСУЖДЕНИЕ

Измерение объема ооцитов травяной лягушки

Мы измеряли объем ооцитов и фолликулов травяной лягушки на исходной стадии, созревших (после РЗП) и овулировавших и показали, что небольшие, но достоверные изменения объема наблюдаются только у овулировавших ооцитов (табл. 1). Поскольку изменение объема очень невелико, для получения достоверных результатов приходится отбраковывать самок с очень разным размером исходных фолликулов и самок с заметным числом дегенерирующих фолликулов, которые легко отличить по изменению пигментного рисунка. Другим ограничением является время измерения объема овулировавших ооцитов. Наибольшие различия удается получить, если овуляция ооцитов происходит достаточно синхронно: между появлением первых овулировавших ооцитов и овуляцией основной их массы проходит несколько часов. Дело в том, что для овулировавшего ооцита раствор Рингера становится гипертоничным и со временем объем ооцита начинает снижаться (Руднева, 1968, цитировано по Детлаф, 1977). По-видимому, именно с гомогенностью исходной популяции фолликулов и синхронностью стимулированной овуляции связаны различия в

величине изменения объема ооцитов разных самок, выраженные в процентах (табл. 1).

Изменение объема ооцитов амфибий в процессе созревания и овуляции и увеличение поступления ионов

Отсутствие изменения объема ооцитов травяной лягушки в процессе созревания не противоречит литературным данным, поскольку показано, что в процессе созревания ооцитов шпорцевой (*Xenopus laevis*) и леопардовой (*Rana pipiens*) лягушек не изменяется ни объем ооцита, ни содержание воды (Morrill, Ziegler, 1980; Cameron et al., 1983; Lau et al., 1984). С другой стороны, увеличение объема овулировавших ооцитов травяной лягушки, наблюдавшееся в наших опытах, было отмечено и ранее. Объем ооцитов, овулировавших *in vivo*, оказался больше объема исходных ооцитов на 6.7% (Mild, Lovtrup, 1985), а вес — на 6.9% (Руднева, 1968, цитировано по Детлаф, 1977). Эти изменения объема и веса ооцитов, по-видимому, обусловлены поступлением воды, стимулированным поступлением ионов. Во всяком случае, показано, что по сравнению с исходными ооцитами в овулировавших ооцитах жабы-аги (*Bufo marinus*) и синеголовой квакши (*Hyla labialis*) статистически достоверно увеличивается концентрация ионов калия (De Luque al., 1961). Ооцит леопардовой лягушки в процессе овуляции поглощает ионы натрия (Morrill et al., 1974). Увеличение концентрации ионов натрия ко времени овуляции ооцитов леопардовой лягушки наблюдали и Гупта с соавторами (Gupta et al., 1985).

В наших опытах раствор Рингера без ионов калия и оубаин (0.05 мМ) достоверно подавляли увеличение объема окруженных фолликулярными оболочками ооцитов травяной лягушки по сравнению с объемом ооцитов, овулировавших в контроле, и их овуляцию и не влияли на объем “голых” ооцитов. Данных об оубаин-чувствительной Na⁺,K⁺-АТФазе в фолликулярных оболочках,

окружающих ооциты амфибий, нет. Однако показано, что фермент присутствует в гомогенатах яичников леопардовой лягушки (Morrill et al., 1974) и его активность увеличивается в период созревания, достигая максимума незадолго до завершения РЗП. И на стадии профазы мейоза, и в процессе созревания ее активность подавляется оубаином или строфантиндином (1 мМ) (Morrill et al., 1974). Мы предполагаем, что Na^+ , K^+ -АТФаза, ответственная за увеличение объема ооцитов амфибий, локализована в фолликулярных клетках. Предположение о том, что механизм поглощения ионов калия в фолликулах фундулюса локализован в фолликулярных клетках было высказано ранее (Wallace et al., 1992). Локализация Na^+ , K^+ -АТФазы, участвующей в оводнении ооцитов рыб, тоже не известна, поскольку измерения проводили в ткани яичника (Cerda et al., 2007). Возможно, что у лягушки заметную роль в оводнении ооцитов играют и ионы натрия. Наши предварительные опыты показали, что амилорид (ингибитор натриевых каналов) снижает процент овулировавших ооцитов. Однако в отличие от оубаина амилорид заметно влияет на созревание ооцитов, что осложняет его использование при изучении зависимости между увеличением объема и овуляцией. Кроме того, он светочувствителен, что при использовании нашего метода измерения объема, не позволяет проводить повторных измерений, поскольку происходит дезактивация ингибитора. По этим причинам мы не использовали амилорид в наших опытах на фолликулах травяной лягушки.

Роль фолликулярных оболочек

В наших опытах объем “голых” ооцитов травяной лягушки не менялся ни при созревании под влиянием прогестерона в растворе Рингера, ни под влиянием воздействий, подавляющих оводнение ооцитов костистых рыб. Участие фолликулярных клеток в процессе оводнения впервые обнаружено на фолликулах фундулюса. “Голые” ооциты фундулюса нормально созрели, но не увеличивались в объеме. Авторы высказали предположение о том, что фолликулярные клетки обеспечивают транспорт в ооцит воды или ионов калия или и того и другого (McPherson et al., 1989; Wallace et al., 1992). Моррилл с соавторами (Morrill et al., 1977) обнаружили, что в фолликуле леопардовой лягушки (*Rana pipiens*) фракция быстро обменивающихся ионов калия связана в основном с фолликулярными оболочками. Уже упоминалось, что “голые” ооциты японского речного угря также не оводняются (Kagawa et al., 2009).

Роль аквапоринов

Используя два ингибитора АП (хлористая ртуть и ММТС), мы показали, что они вызывают досто-

верное снижение объема ооцитов травяной лягушки по сравнению с объемом ооцитов, овулировавших в контроле. Ингибиторы действовали только в присутствии фолликулярных оболочек, не влияли на созревание ооцитов, стимулированное прогестероном, но подавляли овуляцию.

Подавление хлористой ртутью оводнения окруженных фолликулярными оболочками ооцитов ранее описано у дорады (Fabra et al., 2005) и японского речного угря (Kagawa et al., 2009). Подавление оводнения у этих видов не влияло на созревание ооцитов, стимулированное мейоз-индуцирующим стероидом (Fabra et al., 2005; Kagawa et al., 2009) и не происходило в отсутствие фолликулярных клеток (McPherson et al., 1989; Kagawa et al., 2009). Снижение объема фолликулов рыб зависело от концентрации хлористой ртути (Fabra et al., 2005; Kagawa et al., 2009), для фолликулов травяной лягушки такой зависимости не обнаружено.

Остановимся подробнее на данных об АП в ооцитах рыб и амфибий. Как в ооцитах рыб, которым свойственно выраженное оводнение (дорада, японский речной угорь), так и в ооцитах пресноводных рыб, оводняющихся незначительно (речной сом), обнаружен специфичный для костистых рыб АП, относящийся к подсемейству – *aqp1b* (Fabra et al., 2005, 2006, Tingaud-Sequeira et al., 2008; Chaube et al., 2011; Kagawa et al., 2011). *aqp1b* обнаружен даже в яичнике данио (*Danio rerio*) (Tingaud-Sequeira et al., 2010), ооциты которого практически не претерпевают оводнения (Selman et al., 1993).

Первые данные, позволяющие предполагать существование водных каналов в ооцитах амфибий, были получены на песочной жабе (*Bufo arenarum*) (Capurro et al., 1994). Капуро с соавторами показали, что проницаемость ооцитов жаб для воды значительно выше, чем у ооцитов шпорцевых лягушек. Более того, хлористая ртуть в концентрации 300 мкМ обратимо подавляла осмотическую проницаемость ооцитов жаб и не влияла на проницаемость ооцитов лягушек. Авторы пришли к выводу о том, что в ооцитах жаб в отличие от ооцитов шпорцевых лягушек присутствуют водные каналы. Инъекция мРНК, полученной из ооцитов жаб в ооциты шпорцевых лягушек, увеличивала осмотическую проницаемость последних, теперь она обратимо снижалась при обработке ооцитов хлористой ртутью (Ford et al., 1996). Несмотря на то, что физиологическими методами обнаружить присутствие водных каналов в ооцитах шпорцевой лягушки не удалось, оказалось, что в ее ооцитах присутствуют два АП. Шрейбер с соавторами клонировали гомолог АП3 шпорцевой лягушки и обнаружили экспрессию мРНК АП3 в ооцитах (Schreiber et al., 2000). Кроме того, из ооцитов шпорцевой лягушки клонировали новый АП, который был назван АП_{х10} (Virkki et al., 2002). Экспрессия мРНК АП_{х10} в ооцитах шпорцевой лягушки увеличивала их осмотическую проницае-

мость для воды. Уровень экспрессии белка АПх₀, по-видимому, различен в разных ооцитах шпорцевой лягушки. Как уже отмечалось ранее, хлористая ртуть в концентрации 1 мкМ достоверно снижает проницаемость ооцитов шпорцевой лягушки для воды (Virkki et al., 2002). Однако, судя по тому, что эта проницаемость очень невелика и хлористая ртуть или не влияет на нее (Sarrigo et al., 1994; Schreiber et al., 1997, 2000), или вызывает лишь небольшое снижение (Virkki et al., 2002), эндогенных белков АПЗ и АПх₀ в ее ооцитах очень мало. Об АП в ооцитах травяной лягушки ничего не известно.

Мы не наблюдали снижения объема “голых” ооцитов травяной лягушки под влиянием хлористой ртути (0.1–20 мкМ) и ММТС. У дорады и угря такие попытки не предпринимались. Капуно с соавторами наблюдали снижение под влиянием хлористой ртути (300 мкМ) объема “голых” ооцитов жабы, но не шпорцевой лягушки (Sarrigo et al., 1994), а Вирки с соавторами – и “голых” ооцитов шпорцевой лягушки под влиянием очень низких концентраций хлористой ртути (Virkki et al., 2002). С чем связана такая разница в реакции ооцитов на хлористую ртуть даже при проведении опытов на ооцитах одного вида амфибий сказать трудно.

В фолликуле низших позвоночных АП обнаружены только в ооцитах, но фолликулярные клетки необходимы для оводнения (McPherson et al., 1989; Fabra et al., 2005; Kagawa et al., 2009). Какова же их роль? Уоллес с соавторами (Wallace et al., 1992) предположили, что в фолликулярных клетках локализован механизм поглощения ионов калия, которые переходят в ооцит по щелевым контактам. С тех пор при изучении роли гетерологичных щелевых контактов между ооцитом и фолликулярными клетками получены противоречивые результаты. Серда с соавторами (Serda et al., 1993) показали, что активатор протеинкиназы С (форболовый эфир форбол-12-миристинат-13-ацетат) и 1-октанол, которые разобщают щелевые контакты, подавляют оводнение фолликулов фундулюса, а Кагава с соавторами (Kagawa et al., 2009), что два других ингибитора щелевых контактов (карбенксалон и 1-октанол) не влияют на оводнение ооцитов японского речного угря. В последнем случае, однако, не доказано, что ингибиторы действительно подавляют щелевые контакты. Являются ли фолликулярные клетки источником какого-то воздействия, стимулирующего оводнение ооцитов, или в процессе их удаления ооциты повреждаются и теряют способность к оводнению, пока сказать трудно.

Роль оводнения в овуляции

Показано, что у карпа (*Cyprinus carpio*) и золотой рыбки (*Carassius auratus*) содержание воды в яичнике выше у овулирующих самок, чем у неовулирующих как при индуцированной гормоном, так и

при естественной овуляции (Clemens, Grant, 1964). Авторы пришли к выводу о том, что увеличение содержания воды представляет собой часть процесса овуляции. Сходные результаты были получены для аю (*Plecoglossus altivelis*) (Hirose et al., 1974). Оказалось, что содержание воды и ионов в яичнике аю увеличивалось после инъекции самкам хорионического гонадотропина человека. На основании подобных наблюдений было высказано предположение о том, что оводнение ооцитов рыб может играть роль в механизме овуляции (Hirose, 1976). В дальнейшем подобные предположения высказывались неоднократно: разбухание ооцита может механически способствовать разрушению фолликула и выходу ооцита медаки (Pendegrass, Schroeder, 1976), увеличение внутрифолликулярного давления необходимо для овуляции ооцитов дальневосточного морского карася (Yueh, Chang, 2000), оводнение, происходящее непосредственно перед овуляцией, необходимо для завершения овуляции радужной форели (Milla et al., 2006). Мы попытались проверить это предположение экспериментально и показали, что в процессе овуляции ооцитов травяной лягушки под влиянием гонадотропных гормонов гипофиза их объем достоверно увеличивается. Воздействия, подавляющие оводнение ооцитов костистых рыб: отсутствие ионов калия в среде, подавление Na⁺, K⁺-АТФазы и водных каналов приводят к подавлению увеличения объема ооцитов и снижают процент овулировавших ооцитов. По-видимому, есть основания считать, что в процессе овуляции ооцитов травяной лягушки происходит их оводнение, играющее какую-то роль в механизме овуляции. Вопросы о том, справедливо ли это для других низших позвоночных (как имеющих ген *aqp1b*, так и не имеющих его) и какую роль играет оводнение (даже столь незначительное, как у травяной лягушки) в механизме овуляции пока остаются открытыми.

Автор выражает глубокую признательность Б.Ф. Гончарову за помощь в разработке метода измерения объема фолликулов и ценные замечания при подготовке статьи и Г.А. Клевезаль за помощь в статистической обработке материала.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Детлаф Т.А. Становление организации зрелого яйца у амфибий и рыб на заключительных стадиях оогенеза, в период созревания // Современные проблемы оогенеза / Ред. Мицкевич М.С., Детлаф Т.А. и др. М.: Наука, 1977. С. 5–50.
- Руднева Т.Б. 1968, цитировано по Детлаф Т.А., 1977.
- Скоблина М.Н., Кондратьева О.Т. Созревание *in vitro* ооцитов травяной лягушки, одетых фолликулярными оболочками и лишенных их под действием холестерина // Онтогенез. 1983. Т. 14. С. 484–490.
- Скоблина М.Н., Кондратьева О.Т., Никифорова Г.П., Хухтаниemi И. Влияние ингибитора хлорных каналов и сред со сниженной концентрацией ионов

- хлора на овуляцию ооцитов травяной лягушки // Там же. 1996. Т. 27. С. 434–439.
- Agre P., King L.S., Yasui M. et al. Aquaporin water channels – from atomic structure to clinical medicine // J. Physiol. 2002. V. 542. P. 3–16.
- Cameron I.L., LaBadie D.R., Hunter K.E., Hazlewood C.F. Changes in water proton relaxation times and in nuclear to cytoplasmic element gradients during meiotic maturation of *Xenopus* oocytes // J. Cell Physiol. 1983. V. 116. P. 87–92.
- Capurro C., Ford P., Ibarra C. et al. Water permeability properties of the ovarian oocytes from *Bufo arenarum* and *Xenopus laevis*: a comparative study // J. Membr. Biol. 1994. V. 138. P. 51–57.
- Cerda J.L., Petrino T.R., Wallace R.A. Functional heterologous gap junctions in *Fundulus* ovarian follicles maintain meiotic arrest and permit hydration during oocyte maturation // Dev. Biol. 1993. V. 160. P. 228–235.
- Cerda J., Fabra M., Raldúa D. Physiological and molecular basis of fish oocyte hydration // The fish oocyte. Eds. Babin P.J. et al. Netherlands: Springer, 2007. P. 349–396.
- Chaube R., Chauvigné F., Tingaud-Sequeira A. et al. Molecular and functional characterization of catfish (*Heteropneustes fossilis*) aquaporin-1b: changes in expression during ovarian development and hormone-induced follicular maturation // Gen. Comp. Endocrinol. 2011. V. 170. P. 162–171.
- Clemens H.P., Grant F.B. Gonadal hydration of carp (*Cyprinus carpio*) and goldfish (*Carassius auratus*) after injections of pituitary extracts // Zoologica. 1964. V. 49. P. 193–210.
- Craik J.C.A., Harvey S.M. The causes of buoyancy in egg of marine teleosts // J. Mar. Biol. Assoc. 1987. V. 67. P. 169–182.
- De Luque O., Hunter A.S., Hunter F.R. Osmotic studies of amphibian eggs. III. Ovulated eggs // Biol. Bull. 1961. V. 121. P. 497–506.
- Fabra M., Raldúa D., Power D.M. et al. Marine fish egg hydration is aquaporin-mediated // Science. 2005. V. 307. P. 545.
- Fabra M., Raldúa D., Bozzo M. et al. Yolk proteolysis and aquaporin-1o play essential roles to regulate fish oocyte hydration during meiosis resumption // Dev. Biol. 2006. V. 295. P. 250–262.
- Ford J.K., Amodeo G., Capurro C. et al. Progesterone inhibition of water permeability in *Bufo arenarum* oocytes and urinary bladder // Am. J. Physiol. 1996. V. 270. P. F880–F885.
- Gupta R.K., Kostellow A.B., Morrill G.A. NMR studies of intracellular sodium ions in amphibian oocytes, ovulated eggs, and early embryos // J. Biol. Chem. 1985. V. 260. P. 9203–9208.
- Hirose K. Endocrine control of ovulation in medaka (*Oryzias latipes*) and ayu (*Plecoglossus altivelis*) // J. Fish. Res. Bd. Can. 1976. V. 33. P. 989–994.
- Hirose K., Hirano T., Ishida R. Effects of salmon gonadotropin on ovulation in ayu, *Plecoglossus altivelis*, with special reference to water balance // Comp. Biochem. Physiol. 1974. V. 47A. P. 283–289.
- Kagawa H., Horiuchi Y., Kasuga Y., Kishi T. Oocyte hydration in the Japanese eel (*Anguilla japonica*) during meiosis resumption and ovulation // J. Exp. Zool. Part A. Ecol. Gen. Physiol. 2009. V. 311A. P. 752–762.
- Kagawa H., Kishi T., Gen K. et al. Expression and localization of Atlantic croaker and spotted seatrout oocytes during final maturation // Reprod. Biol. Endocrinol. 2011. V. 9. P. 71–80.
- Kida H.T., Miyoshi K., Manabe N. et al. Roles of aquaporin-3 Water channels in volume-regulatory water flow in a human epithelial cell line // J. Membr. Biol. 2005. V. 208. P. 55–64.
- Kurbannazarova R.S., Tashmukhamedov B.A., Sabirov R.Z. Osmotic water permeability and regulatory volume decrease of rat thymocytes // Gen. Physiol. Biophys. 2003. V. 22. P. 221–232.
- LaFleur G.J., Jr., Thomas P. Evidence for a role of Na⁺,K⁽⁺⁾-ATPase in the hydration of Atlantic croaker and spotted seatrout oocytes during final maturation // J. Exp. Zool. 1991. V. 258. P. 126–136.
- Lau Y.T., Reynhout J.K., Horowitz S.B. Regional water changes during oocyte meiotic maturation: evidence of ooplasmic segregation // Dev. Biol. 1984. V. 104. P. 106–110.
- Masui Y., Clarke H.J. Oocyte maturation // Intern. Rev. Cytol. 1979. V. 57. P. 185–282.
- McPherson R., Greeley M.S., Wallace R.A. The influence of yolk protein proteolysis on hydration in oocytes of *Fundulus heteroclitus* // Dev. Growth. Differ. 1989. V. 31. P. 475–483.
- Mild K.H., Lovtrup S. Movement and structure of water in animal cells. Ideas and experiments // Biochem. Biophys. Acta. 1985. V. 822. P. 155–167.
- Milla S., Jalabert B., Rime H. et al. Hydration of rainbow trout oocyte during meiotic maturation and *in vitro* regulation by 17,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one and cortisol // J. Exp. Biol. 2006. V. 209. P. 1147–1156.
- Morrill G.A., Ziegler D. Na⁺ and K⁺ uptake and exchange by the amphibian oocyte during the first meiotic division // Dev. Biol. 1980. V. 74. P. 216–223.
- Morrill G.A., Kostellow A., Murphy J.B. Role of Na⁺, K⁺ ATPase in early embryonic development // Ann. NY Acad. Sci. 1974. V. 242. P. 543–559.
- Morrill G.A., Ziegler D., Zabrenetzky V.S. An analysis of transport, exchange, and binding of sodium and potassium in isolated amphibian follicles // J. Cell Sci. 1977. V. 26. P. 311–322.
- Nagahama Y. Endocrine control of oocyte maturation in teleosts // Prog. Clin. Biol. Res. 1990. V. 342. P. 385–392.
- Pendergrass P., Schroeder P. The ultrastructure of the thecal cell of the teleost, *Oryzias latipes*, during ovulation *in vitro* // J. Reprod. Fertil. 1976. V. 47. P. 229–233.
- Schreiber R., Greger R., Nitschke R. et al. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator activates water conductance in *Xenopus* oocytes // Pflügers Archiv. 1997. V. 434. P. 841–847.
- Schreiber R., Pavenstadt H., Greger R. et al. Aquaporin 3 cloned from *Xenopus laevis* is regulated by the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator // FEBS Lett. 2000. V. 475. P. 291–295.
- Selman K., Wallace R.A., Sarka A., Qi X. Stages of oocyte development in zebrafish, *Brachidanio rerio* // J. Morph. 1993. V. 218. P. 203–224.

- Tingaud-Sequeira A., Chauvigne F., Fabra M. et al.* Structural and functional divergence of two fish aquaporin-1 water channels following teleost-specific gene duplication // *BMC Evol. Biol.* 2008. V. 8. P. 259–277.
- Tingaud-Sequeira A., Calusinska M., Finn R.N. et al.* The zebrafish genome encodes the largest vertebrate repertoire of functional aquaporins with dual paralogy and substrate specificities similar to mammals // *BMC Evol. Biol.* 2010. V. 10. P. 38–54.
- Virkki L.V., Franke C., Somieski P., Boron W.F.* Cloning and functional characterization of a novel aquaporin from *Xenopus laevis* oocytes // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. P. 40610–40616.
- Wallace R.A., Selman K.* Oogenesis in *Fundulus heteroclitus*. I. Preliminary observations on oocyte maturation *in vivo* and *in vitro* // *Dev. Biol.* 1978. V. 62. P. 354–369.
- Wallace R.A., Greeley M.S., Jr., McPherson R.* Analytical and experimental studies on the relationship between Na^+ , K^+ , and water uptake during volume increases associated with *Fundulus* oocyte maturation *in vitro* // *J. Comp. Physiol. [B]*. 1992. V. 162. P. 241–248.
- Yueh W.S., Chang C.F.* Morphological changes and competence of maturing oocytes in protandrous black porgy, *Acanthopagrus schlegeli* // *Zool. Studies.* 2000. V. 39. P. 114–122.

Role of Hydration in Ovulation of Common Frog Oocytes *in vitro*

M. N. Skoblina

Kol'tsov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 26, Moscow, 119334 Russia
e-mail: skoblina38@mail.ru

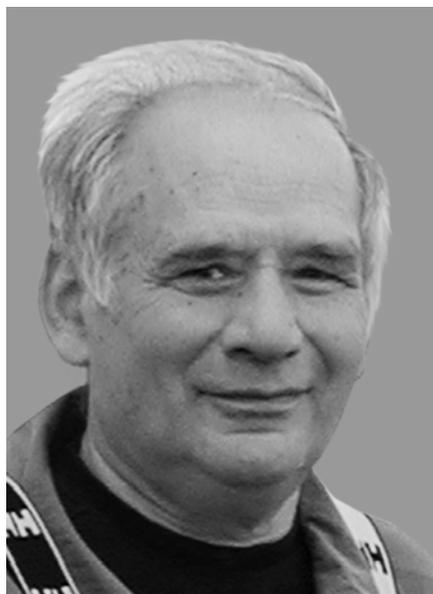
Abstract—Stimulation of ovulation of the common frog *Rana temporaria* oocytes with homologous pituitary extract caused an increase in their volume. Factors that are known to inhibit hydration in teleostean oocytes (potassium-free Ringer solution and inhibitor of Na^+ , K^+ -ATPase – ouabain), as well as use of aquaporin inhibitors (mercuric chloride and methylmethanethiosulphonate) inhibited also homologous pituitary extract-induced volume increase in follicle-enclosed oocytes and led to reduced percentage of ovulated oocytes. Volume of denuded oocytes remained unchanged in the course of maturation when exposed to progesterone or other treatments. The data obtained suggest that stimulation of oocyte ovulation in the common frog caused an increase in their hydration that is necessary for their ovulation but this did not occur in denuded cells.

Keywords: oocyte, follicle, maturation, ovulation, hydration, aquaporins, ouabain, mercuric chloride, methylmethanethiosulphonate, amphibians.

УДК 591

ГЕННАДИЙ АЛЕКСЕЕВИЧ БУЗНИКОВ (1931–2012)

DOI: 10.7868/S0475145013040095



27 августа 2012 года в США после тяжелой болезни скончался доктор биологических наук, профессор Геннадий Алексеевич Бузников – выдающийся советский и российский ученый, создатель нового направления в биологии развития – изучения эмбриональных функций нейромедиаторных веществ.

Геннадий Алексеевич Бузников родился 18 января 1931 года в Ленинграде, и эпоха наложила на его детство и юность тяжелый отпечаток: в конце 30-х был репрессирован его отец, а осенью 1941 года в 10-летнем возрасте сам он был эвакуирован перед самой блокадой и оказался в детском доме Ленинградского Литфонда в Приуралье. Сил и способностей Г.А. Бузникова, однако, хватило для отличного окончания школы и поступления на Биологический факультет Московского Государственного Университета.

Беды и на этом этапе не обошли его стороной: очередная волна репрессий затронула его мать, и семья оказалась лишенной средств к существованию, кроме студенческой стипендии и приработков Геннадия Алексеевича. Тем не менее, его научная карьера развивалась успешно, и начатые в студенчестве под руководством чл.-корр. АН СССР Хачатура Седраковича Коштоянца исследования роли гиалуронидазы в вылуплении костистых рыб (Бузников, 1955) стали основой защищенной в 1956 г. кандидатской диссертации, результаты которой до сих пор остаются актуаль-

ными. Однако не это направление стало в научной жизни Г.А. Бузникова основным.

События, определившие его дальнейшую судьбу, произошли в конце 1950-х гг., когда в сотрудничестве с Б.Н. Манухиным был впервые в истории физиологии показан эффект серотонина в донервном развитии (на личинке брюхоногого моллюска) (Бузников, Манухин, 1961). Именно эта работа стала первым камнем в основании нового направления – исследования эмбриональных функций нейромедиаторов. Важную роль в дальнейших исследованиях сыграла разработанная Г.А. Бузниковым схема эксперимента, которая по праву должна называться его именем. Г.А. Бузников стал исследовать чувствительность к антагонистам нейромедиаторов зародышей морских ежей в период делений дробления. Практически неограниченное количество зародышей в эксперименте (и, соответственно, статистическая достоверность результата), возможность работы на практически синхронной культуре генетически однородного материала и высокая скорость развития сделали эту схему опытов чрезвычайно продуктивной и надежной.

Новое направление в физиологии с первых же шагов стало приносить своему первооткрывателю изобильные научные результаты. Первым из них стало обнаружение самой по себе чувствительности ранних зародышей, начиная с одноклеточной стадии, к антагонистам медиаторов (Бузников, 1963), которые в физиологических концентраци-

ях специфически блокировали развитие. В тех же опытах выявилась и еще одна неожиданная особенность эмбрионального медиаторного процесса: оказалось, что ранние зародыши морских ежей обладают чувствительностью к антагонистам нескольких нейромедиаторов одновременно. Логично предпринятое вслед за этим исследование содержания медиаторов в эмбрионах продемонстрировало, что и самих медиаторов в них присутствует сразу несколько — серотонин, катехоламины и ацетилхолин (Vuznikov et al., 1964), что выглядело вопиющим противоречием классическому принципу Дэйла “один нейрон — один медиатор”. Эти пионерские данные стали основой защищенной Г.А. Бузниковым в 1966 году докторской диссертации, а затем и монографии “Низкомолекулярные регуляторы зародышевого развития” — первой в истории фундаментальной работы в этой области (Бузников, 1967).

Однако и этим список удивительных открытий Г.А. Бузникова уже на первых этапах исследования не исчерпывается. На основании многочисленных экспериментов им было сделано предположение о внутриклеточной локализации эмбриональных медиаторных рецепторов. От Г.А. Бузникова потребовалось большое научное мужество, чтобы вопреки авторитетным коллегам, и без того считавшим, что “медиаторам нечего делать в эмбрионах”, заявить столь нетривиальную идею. Исследования с использованием специально синтезированных антагонистов серотонина, различающихся по липофильности, а, следовательно, их способности проникать в клетку, это предположение подтвердили. Позднее сотрудниками Г.А. Бузникова методом микроинъекции было получено и прямое доказательство внутриклеточной чувствительности зародышей шпорцевой лягушки к антагонистам медиаторных рецепторов (Шмуклер и др., 1984).

В 1977 году в Институте биологии развития была образована под руководством Г.А. Бузникова Лаборатория эмбриофизиологии, в которой также работали и сотрудники Группы испытаний эмбриотоксических и цитотоксических препаратов НИИ по БИХС, которой Г.А. Бузников руководил на общественных началах с 1974 года. Бузников характеризовал ситуацию в исследованиях эмбриональных трансмиссивных механизмов так: — Идей больше, чем людей, — поэтому большинство его сотрудников имело самостоятельные направления работы. В их деятельность Геннадий Алексеевич вмешиваться не любил, полагая, что у научного работника должна быть своя голова на плечах. Он был переполнен собственными идеями, сам ставил множество опытов, но и был чрезвычайно внимателен к результатам своих коллег, конструктивно обсуждал и поддерживал их инициативы.

Слаженной и продуктивной работе коллектива в чрезвычайной степени способствовала интел-

лигентная и доброжелательная атмосфера в Лаборатории, подкрепляемая тесным общением в экспедициях на Баренцево, Японское, Средиземное и Южно-Китайское моря, где Г.А. Бузников был не только научным и интеллектуальным лидером, но также и своей личностью задавал тон в работе и в отношениях, подавая пример неприхотливости, терпения и фантастического трудолюбия.

Среди новых направлений работ, которые стали развиваться с образованием Лаборатории эмбриофизиологии, были исследования эмбриональных межклеточных взаимодействий, которые продемонстрировали способность антагонистов серотонина блокировать функциональные межклеточные взаимодействия у ранних зародышей морских ежей. Исходно Г.А. Бузников предполагал, что медиаторы могут в той или иной форме участвовать в этих процессах, но их роль в качестве межклеточных посредников считал маловероятной. Тем не менее, последующие работы показали, что серотонин может действовать и как собственно межклеточный посредник (Vuznikov, Shmukler, 1981). С этими работами Лаборатории, а также с изучением роли медиаторов в созревании ооцитов (Бузников и др., 1990) связано и изменение представлений о локализации эмбриональных медиаторных рецепторов — полученные результаты заставили принять возможность одновременного присутствия у зародышей рецепторов, локализованных и внутриклеточно, и на поверхностной мембране клетки (Shmukler, Vuznikov, 1998), что еще более усложнило картину медиаторной регуляции раннего развития. В самое последнее время в созданном Г.А. Бузниковым коллективе установлено, что в эмбриональных клетках не только присутствует одновременно несколько трансмиссивных, но и к одному и тому же трансмиссиву может экспрессироваться несколько типов рецепторов одновременно (Nikishin et al., 2012). К сожалению, об этих работах Г.А. Бузников уже не узнал.

С начала 1980-х гг., наряду с перечисленными выше исследованиями, в Лаборатории началось активное изучение связи между медиаторами и системами вторичных мессенджеров в раннем эмбриогенезе. Были изучены динамика цАМФ и локализация активности аденилатциклазы в ранних зародышах морских ежей, а также показано защитное действие циклических нуклеотидов против эмбриостатических антагонистов серотониновых рецепторов. Все эти материалы послужили основой при написании новой монографии “Нейротрансмиссивы в эмбриогенезе” (Бузников, 1987), в подготовке которой принял участие весь коллектив Лаборатории. Впоследствии книга, отразившая и историю развития этого научного направления, и весь спектр современных тому моменту данных была переведена на английский язык.

Фактически в этот период времени Г.А. Бузников занимал место не только первооткрывателя

научного направления, но и вместе с созданным им коллективом — мирового лидера исследований в этой области знания. Этого, однако, оказалось недостаточным для избрания Г.А. Бузникова в Академию Наук СССР. Уникальная ситуация — советский ученый, который являлся отцом-основателем признанного в мировой науке направления, дважды не был избран член-корреспондентом, а впоследствии отказывался от попыток выдвижения. Конечно, здесь сказались сосредоточенность Г.А. Бузникова на научных исследованиях и неспособность к административным интригам.

Наступившие новые времена вызывали у Г.А. Бузникова большие опасения за развитие отечественной науки (оправдавшиеся, к сожалению), однако, наряду со стремительным обнищанием появились и новые возможности, которыми в значительной степени удалось воспользоваться. В частности, в 1994—1995 гг. Г.А. Бузников имел возможность поработать в лабораториях Университетского Колледжа Лондона и Ньюкаслского Университета (Великобритания), где впервые удалось изучить влияние трансмиттеров и их антагонистов на внутриклеточный уровень кальция. Результатом этих поездок стала серия статей в международных журналах, а также мини-монография “From oocyte to neuron: do neurotransmitters function in the same way throughout development?”, опубликованная в журнале *Molecular and Cellular Neurobiology* (Buznikov et al., 1996).

А в 1996 году Г.А. Бузников получил приглашение на работу в Университет Северной Каролины, где и провел последние годы своей научной жизни. Его работы этого периода были посвящены, в частности, влиянию медиаторов на патогенез болезни Альцгеймера (Buznikov et al., 2008). В эти же годы в сотрудничестве с московскими коллегами Г.А. Бузников активно развивал исследования по своей последней революционной научной идее — возможности существования нового типа эндогенных регуляторов эмбрионального развития — конъюгатов трансмиттеров с функционированными жирными кислотами (Бузников, Безуглов, 2000).

До последней возможности Г.А. Бузников поддерживал научные контакты со своими сотрудниками в ИБР и летом 2010 года в последний раз посетил свой коллектив и обсуждал научные достижения и планы своих выучеников. Шестеро сотрудников и аспирантов Г.А. Бузникова защитили под его руководством диссертации кандидатов биологических наук, а один из них — и докторскую. В настоящее время подготовлена к защите кандидатская диссертация аспиранта из уже следующего поколения последователей Г.А. Бузникова, и есть надежда, что его научное направление, зародившееся в стенах Института биологии развития, не угаснет.

Ю.Б. Шмуклер

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Бузников Г.А. Материалы по физиологии и биохимии развития икры костистых рыб. Гиалуронидаза и “фермент вылупления” // *Вопр. Ихтиологии*. 1955. № 3. С. 104—125.
- Бузников Г.А., Манухин Б.Н. Серотониноподобное вещество в эмбриогенезе некоторых брюхоногих моллюсков // *Журн. Общ. Биол.* 1961. Т. 22. С. 226—232.
- Бузников Г.А. Применение дериватов триптамина для изучения роли 5-окситриптамина (серотонина) в эмбриональном развитии беспозвоночных // *Докл. АН СССР*. 1963. Т. 152. № 5. С. 1270—1272.
- Buznikov G.A., Chyudakova I.V., Zvezdina N.D. The role of neurohumours in early embryogenesis. I. Serotonin content of developing embryos of sea urchin and loach // *J. Embryol. Exp. Morphol.* 1964. № 12. P. 563—573.
- Бузников Г.А. Низкомолекулярные регуляторы зародышевого развития. М.: Наука, 1967. 265 с.
- Шмуклер Ю.Б., Григорьев Н.Г., Бузников Г.А., Турпаев Т.М. Специфическое торможение делений дробления у *Xenopus laevis* при микроинъекции пропранолола // *Докл. АН СССР*. 1984. Т. 274. № 4. С. 994—997.
- Buznikov G.A., Shmukler Yu.B. The possible role of “pre-ervous” neurotransmitters in cellular interactions of early embryogenesis: a hypothesis // *Neurochem. Res.* 1981. V. 6. № 1. P. 55—69.
- Бузников Г.А., Мальченко Л.А., Никитина Л.А., Галанов А.Ю., Еманов В.С. Эффект нейротрансмиттеров и их антагонистов на созревание ооцитов. I. Эффект серотонина и его антагонистов на чувствительность ооцитов морской звезды к 1-метиладенину // *Онтогенез*. 1990. Т. 21. С. 375—380.
- Shmukler Yu.B., Buznikov G.A. Functional coupling of neurotransmitters with second messengers during cleavage divisions: facts and hypotheses // *Perspect. Dev. Neurobiol.* 1998. № 5. P. 469—480.
- Nikishin D.A., Kremnyov S.V., Konduktorova V.V., Shmukler Yu.B. Expression of serotonergic system components during early *Xenopus embryogenesis* // *Int. J. Develop. Biol.* 2012. V. 56. P. 385—391.
- Бузников Г.А. Нейротрансмиттеры в эмбриогенезе. М.: Наука, 1987.
- Buznikov G.A., Shmukler Yu.B., Lauder J.M. From oocyte to neuron: do neurotransmitters function in the same way throughout development? // *Molec. Cell Neurobiol.* 1996. V. 16. P. 32—55.
- Buznikov G.A., Nikitina L.A., Seidler F.J., Slotkin T.A., Bezuglov V.V., Milošević I., Lazarević L., Rogač L., Ruždijić S., Rakić L.M. Amyloid precursor protein 96—110 and β -amyloid 1—42 elicit developmental anomalies in sea urchin embryos and larvae that are alleviated by neurotransmitter analogs for acetylcholine, serotonin and cannabinoids // *Neurotoxicol. Teratol.* 2008. V. 30. № 6. P. 503—509.
- Бузников Г.А., Безуглов В.В. 5-Гидрокситриптаминиды и 3-гидрокситирамиды полиеновых жирных кислот в изучении донервных функций биогенных моноаминов // *Рос. физиол. журн.* 2000. Т. 86. С. 1093—1108.