

БИОЛОГИЯ

УДК 591.343

И. П. Комарова

Особенности эмбриогенеза конечностей амфибий в норме и эксперименте

Работа выполнена в рамках государственного задания на выполнение НИР вузу в 2013 году, проект № 4.7624.2013

Изучен эмбриогенез конечностей амфибий в норме и при экспериментальном воздействии тиреоидных гормонов и тяжелых металлов. Показано эмбриотоксическое действие кадмия, проявляющееся в замедлении гистогенеза, увеличении продолжительности метаморфоза. Тиреоидные гормоны задерживают метаморфоз при внесении на седьмые сутки развития, ускоряют его при внесении на двенадцатые сутки, приводят к аномалиям развития.

Ключевые слова: эмбриогенез конечности, тиреоидные гормоны, тяжелые металлы (кадмий), эмбриотоксическое действие, гистогенез, метаморфоз, тератогенез.

I. P. Komarova

Features of embryogenesis of amphibians' limbs in norm and experiment

Embryogenesis of amphibian limbs in norm is studied. Experimental effects of hormones and heavy metals on the development are considered. Embryotoxicity of cadmium appears to slow down the histogenesis, increases the duration of metamorphosis. Thyroid hormones delay metamorphosis when are intruded on the 7th day of development, accelerate it when are intruded on the 12th day leading to anomalies in development.

Keywords: embryogenesis, a limb, hormones and heavy metals, development, embryotoxicity, cadmium, histogenesis, metamorphosis, anomalies in development.

Лягушка травяная (*RANA TEMPORARIA*, *ANURA*, *AMPHIBIA*) – объект, который на протяжении многих лет используется в эмбриологии животных, как удобная модель для наблюдения за формированием, развитием и закладкой различных систем, что связано с уникальным циклом развития земноводных. Преимущество исследования эмбрионального развития земноводных по сравнению с другими позвоночными состоит в том, что есть возможность исследовать развитие не только путем изучения постоянных эмбриологических препаратов, но и визуально оценивать все особенности развития. Можно проводить оценку влияния различных тератогенных факторов на развитие и закладку систем, отслеживать дальнейшее развитие, жизнь уже взрослой особи и возможное потомство, в эмбриогенезе травяной лягушки существует четко сформированная система постадийного развития ротового и опорно-двигательного аппарата, отклонения от этой системы является наиболее

наглядным проявлением влияния различных тератогенов на эмбриогенез животного.

В связи с этим целью работы было: изучить эмбриогенез передних и задних конечностей лягушки травяной *Rana Temporaria* в норме и эксперименте с ионами кадмия и тиреоидным гормоном.

Изучено 213 личинок лягушки на разных стадиях развития (от 35-ой до 54-ой) охватывающий основной органогенез конечностей, личинки были разложены на серии сагиттальных гистологических срезов, дополнительно проведено окрашивание ализариновым красным и альциановым синим для детализации процессов хондрогенеза и оссификации. Развитие конечностей является важным показателем стадии формирования не только скелета, но и других внутренних органов. Передние и задние конечности начинают прорываться из боковых складок тела на 39-ой стадии и формируются полностью к 54-ой стадии, с 36-ой по 54-ую стадию скелет личинки лягушки травяной последовательно проходит стадии развития:

мезенхимная – 36–38-ая стадии, молодого и зрелого хряща – 40–44-ая, оссификации – 47–54-ая стадии, оссификация конечностей начинается с диафизов костей.

Гистологические особенности развития головастиков в среде с сульфидом кадмия (в дозе 0,001 г\л). Рассмотрение данных стадий производилось после окрашивания тотальных препаратов конечностей личинки ализариновым синим и ализариновым красным. В норме (контролем служили особи, взятые в тех же загородных прудах и выращиваемые параллельно в лаборатории в природной воде) с 44-ой стадии на гистологических срезах передней и задней конечности обнаруживаются участки с зеленым окрашиванием, гистохимически свидетельствующие о начале хондрогенеза. Такую окраску имеют третий, четвертый и пятый пальцы, закладки плеча, предплечья, голени и бедра. При выращивании личинок в среде с ионами кадмия, на аналогичной стадии развития головастика, закладки хрящевых структур практически отсутствуют. Длина конечности в эксперименте – уменьшается в среднем на 1,4 мм, уменьшается и длина тела.

На 45-ой стадии в норме наблюдается формирование молодого хряща во всех элементах конечностей. В экспериментальной среде (с кадмием) этого не происходит, хрящ слабо дифференцирован, анатомически лапки слабо оформлены. Конечности значительно укорочены (в среднем на 2,45 мм).

Для 46-ой стадии в норме характерно оформление хрящевых зачатков костей плеча, локтя, голени и бедра, к 48–50-ой – появляются очаги оссификации. У экспериментальных образцов к 46-ой стадии происходит ускоренное формирование зачатков пальцев, однако бедро сильно укорачивается, а голень вытягивается, сходным образом изменяется и передняя конечность. Сами конечности по размерам меньше нормы (в норме – $2,69 \pm 0,05$ мм, в эксперименте – $2,08 \pm 0,4$ мм). До конца метаморфоза участков оссификации в конечностях не наблюдается.

Особенности развития конечности в среде с тиреоидным гормоном (эутирокс в дозе 6,3–24 мг/л). Тиреоидные гормоны способны управлять развитием особей в популяции. Так, при высокой плотности организмов, концентрация гормонов увеличивается за счет выделения их в среду теми особями, которые первыми прошли метаморфоз. Они на этот момент опережают большинство в развитии конечностей и скелета, имеют более крупные размеры и, выделяя дополнительно

гормоны, тормозят развитие других членов популяции. Тиреоидные гормоны ускоряют синтез белка, обмен веществ, увеличивают скелетное вытяжение, при этом общий размер личинки не увеличивается, но возрастает размер передних и задних конечностей, что позволяет молодым особям не быть съеденными старшими. Но при этом замедляется качественное развитие – останавливается (затормаживается) гистогенез, замещение хрящевой ткани костной.

При помещении в среду с эутироксом разной концентрации (6,3 мг/л, 12 мг/л, 24 мг/л) головастика на седьмые сутки после выклева (35–38-ая стадии) наблюдалось замедление роста туловища при сохранении темпа развития и роста конечностей, отсутствие элиминации хвоста. К двадцать третьему дню развития все особи погибли, ни одна не прошла полный метаморфоз.

При помещении в среду с гормоном разной концентрации головастика на двенадцатые сутки после выклева (38–40-ая стадии), наблюдается замедление роста только туловища, при дальнейшем развитии и росте конечностей, отсутствует элиминация хвоста. Через пять дней экспозиции (семнадцатый день от оплодотворения) отчетливо заметны задние конечности. В норме это происходит на пятидесятый день от оплодотворения. Линейный рост личинки в начале развития выражен слабо. Размеры тела почти не меняются. На восьмые–девятое сутки эксперимента у всех особей наблюдается изменение в строении черепа, голова приобретает заостренную форму. На одиннадцатый день прорываются передние конечности. На 50-ой стадии у личинок отсутствует элиминация хвоста. Наблюдается десинхрония во 2–3-й стадиях в развитии передних конечностей и головы головастика. Таким образом, наличие торможения в развитии головастика подтверждает данные [1, 2] о задержке организма на стадии личиночного онтогенеза и гетерохронии при воздействии негативных факторов среды.

К концу эксперимента часть особей прошла полный метаморфоз, развитие завершилось на 53-ей стадии (тридцать первый день от оплодотворения, двадцать седьмой день после выклева, пятнадцатый дней экспозиции). В норме полный метаморфоз происходит спустя 70 суток от оплодотворения. Во втором варианте фиксируется резкое увеличение скорости метаморфоза (диагностировалось по времени достижения 53-ей стадии) в 2,5 раза (по литературным данным и показателям нормы для достижения 53-ей ста-

дии необходимо 65 суток, в эксперименте с добавлением гормона на двенадцатые сутки после выклева потребовалось 27 дней). При этом различия в концентрации гормона в диапазоне 6,3–24 мг/л существенной роли не сыграли.

При действии разных концентраций гормона на головастики двадцатого дня после выклева (41–43-я стадии) резких изменений в форме тела и прохождении метаморфоза не наблюдалось. К концу эксперимента ни одна особь не прошла полный метаморфоз, развитие завершилось на 53-ей стадии (двадцать седьмой день после выклева, семь дней экспозиции).

Окраска альциановым синим и ализариновым красным позволила выявить степень сформированности и наличие оксификации в норме и эксперименте. Известно, что естественно низкий или искусственно пониженный уровень тиреоидных гормонов у бесхвостых амфибий не препятствует дифференцировке конечностей, не блокирует

их дальнейший рост, но нормальное формирование дефинитивных конечностей требует непрерывного участия тиреоидных гормонов [1, 2, 3].

При этом показано, что искусственное повышение уровня тиреоидных гормонов у личинок лягушки травяной вызывает ускоренное формирование элементов костного скелета – окостенений. Эти факторы предполагают влияние тиреоидных гормонов на процессы онтогенеза [1].

У экспериментальной особи аналогичной стадии развития не наблюдается ни одного центра оксификации, весь скелет передних и задних конечностей находится на стадии зрелого хряща. Также отмечается неправильная закладка частей скелета предплюсны, плюсны и фаланг пальцев. В отличие от нормы кости предплюсны меньше. У некоторых особей и вовсе часть костей этого ряда отсутствует (рис.1 и 2). Четвертая и пятая кости плюсны не разделяются. Количество фаланг на пальцах уменьшено.

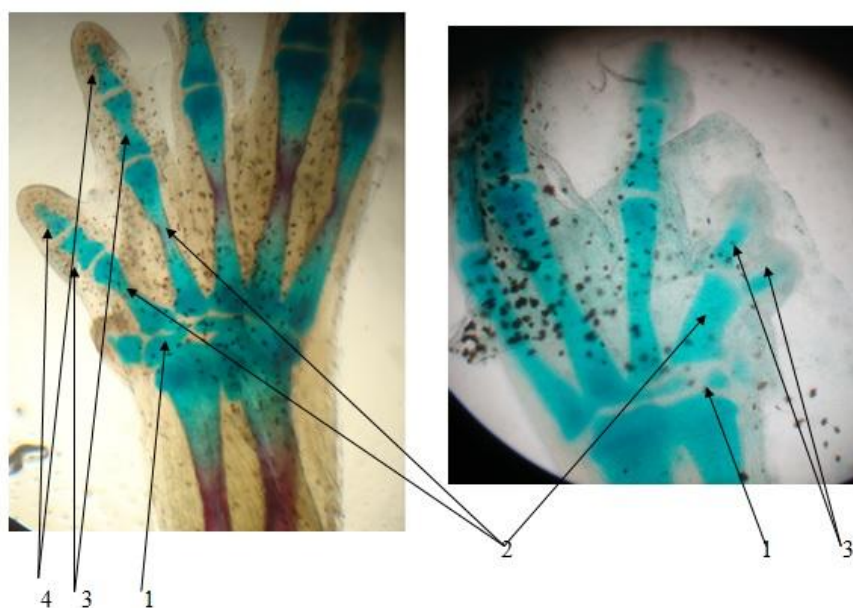


Рис. 1 и 2. Стопа личинки 52-ой стадии в норме (слева) и в среде с тиреоидным гормоном (справа) 8,3 мкг/л.
1 – кости плюсны; 2 – первые фаланги 4 и 5 пальца стопы; 3 – вторые фаланги 4 и 5 пальца стопы;
4 – третьи фаланга 4 и 5 пальцев стопы.

Таким образом, в эксперименте с кадмием наблюдается уменьшение размеров особей и элементов их скелета, отставание в формировании скелетных структур на 1–2 стадии от контроля, нарушается программа развития элементов конечностей, проявляется десинхрония развития частей особи. Тормозится гистогенез – развитие кости прекращается на стадии молодого хряща, костная ткань не появляется.

В среде с гормоном у личинок нарушаются не только процессы линейного роста конечностей, но и формирования молодой хрящевой ткани в плечевой, локтевых, бедренной, большой и малой берцовых костях, а также в кисти, стопе и фалангах пальцев. Помимо уменьшения размерных показателей тела и увеличения длины передних и задних конечностей, идут структурные изменения в опорно-двигательном аппарате: останавливаются процессы оксификации, нару-

шаются процессы дифференцировки элементов скелета задних конечностей (неразделение фаланг пальцев конечностей).

Вне зависимости от концентрации и не смотря на прохождение полного метаморфоза у всех особей, достигших 49–52-ой стадий развития, процессы оссификации не наблюдаются. Отмечено

тератогенное действие гормона: формирование структур, дифференциация которых в норме происходит позднее всех остальных элементов (кости плюсны и фаланги пальцев), нарушена. В среде с гормоном увеличивается скорость метаморфоза в три раза по сравнению с контролем.

Библиографический список

1. Северцова, Е. А. Механизмы адаптационной регуляции эмбриогенеза бесхвостых амфибий, обитающих в условиях антропогенного загрязнения водоемов [Текст] / Е. А. Северцова, А. С. Северцов // Ж. общей биологии, т. 68, 2007. – №5. – С. 323–331.
2. Смирнов, С. В. Метаморфоз хвостатых амфибий: особенности, механизм регуляции и эволюции [Текст] / С. В. Смирнов // Ж. общей биологии, т. 67, 2006. – №5. – С. 323–334.
3. Смирнов, С. В. Прямое развитие у хвостатых амфибий, его становление и эволюция [Текст] / С. В. Смирнов // Ж. общей биологии, т. 69, 2008. – №3. – С. 167–174.

Bibliograficheskiy spisok

1. Severcova, E. A. Mehanizmy adaptacionnoj reguljacji jembriogeneza beshvostyh amfibij, obitajushhih v uslovijah antropogenogo zagrjaznenija vodoemov [Tekst] / E. A. Severcova, A. S. Severcov // Zh. obshhej biologii, t. 68, 2007. – №5. – S. 323–331.
2. Smirnov, S. V. Metamorfoz hvostatyh amfibij: osobennosti, mehanizm reguljacji i jevoljucii [Tekst] / S. V. Smirnov // Zh. obshhej biologii, t. 67, 2006. – №5. – S. 323–334.
3. Smirnov, S. V. Prjamoje razvitie u hvostatyh amfibij, ego stanovlenie i jevoljucija [Tekst] / S. V. Smirnov // Zh. obshhej biologii, t. 69, 2008. – №3. – S. 167–174.