

УДК 591.393

ВЛИЯНИЕ ИЗМЕНЕНИЙ УРОВНЯ ТИРЕОИДНЫХ ГОРМОНОВ НА ОНТОГЕНЕЗ ВЕБЕРОВА АППАРАТА КАРПОВЫХ РЫБ (CYPRINIDAE; TELEOSTEI)

© 2014 г. Д. В. Капитанова*, **, Ф. Н. Шкиль*, **

*Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН
119334, Москва, ул. Вавилова, 26

**Институт проблем экологии и эволюции им А.Н. Северцова РАН
119071, Москва, Ленинский проспект, 33

E-mail: daryakapitanova@gmail.com

Поступила в редакцию 22.01.2014 г.

Окончательный вариант получен 29.05.2014 г.

Экспериментальными методами изучено влияние изменений уровня тиреоидных гормонов (ТГ) на развитие и дефинитивную морфологию Веберова аппарата (ВА), морфофункционального комплекса, обеспечивающего передачу звукового сигнала от плавательного пузыря к лабиринту внутреннего уха, карповых рыб: *Labeobarbus intermedius* и *Danio rerio*. Обнаружены различия в ТГ-реактивности скелетных структур, входящих в состав ВА. Показано, что изменения уровня ТГ вызывают гетерохронии в развитии ВА, т.е. приводят к изменению сроков и темпов онтогенетических событий, что отражается на дефинитивной морфологии как отдельных структур, так и ВА в целом. Обнаружены различия в ТГ-реактивности скелетных структур, входящих в состав ВА. Кроме того, обнаружена внутри- и межвидовая изменчивость ТГ-реактивности.

Ключевые слова: Веберов аппарат, тиреоидные гормоны, карповые рыбы, гетерохронии.

DOI: 10.7868/S0475145014060056

ВВЕДЕНИЕ

Важнейшим отличительным анатомическим признаком рыб надотряда Otophysi (Ostariophysi; Teleostei) является наличие Веберова аппарата (ВА) – сложного морфофункционального комплекса, обеспечивающего передачу звукового сигнала от плавательного пузыря к лабиринту внутреннего уха и позволяющего значительно расширить диапазон воспринимаемых частот (Bird, Hernandez, 2007). Типичный ВА карповых рыб (Cyprinidae; Cypriniformes), строение которого признается многими авторами наиболее близким к предковому состоянию (Rosen, Greenwood, 1970; Chardon, Vandewalle, 1996), включает в себя первые четыре позвонка и их модифицированные элементы. Функционально ВА можно разделить на две части: pars auditum и pars sustentaculum. Первая часть представляет собой функциональный канал, соединяющий переднюю камеру плавательного пузыря с лабиринтом внутреннего уха и обеспечивающий передачу звуковых колебаний. Вторая часть осуществляет поддержку и защиту первой. В состав pars auditum входят scaphium, claustrum, intercalarium и tripus. К pars sustentaculum относятся тела позвонков, боковые отростки пер-

вого и второго позвонков, невральные дуги третьего и четвертого позвонков, ребра четвертого позвонка, os suspensorium, и невральный комплекс (НК) (Bird, Hernandez, 2007) (рис. 1). Особенности строения и онтогенеза ВА являются объектами пристального внимания многих исследователей и широко используются в систематике и филогении Otophysi (Watson, 1939; Ramaswami, 1955; Rosen, Greenwood, 1970; Fink, Fink, 1981; Богуцкая, 1991; Coburn, Futey, 1996; Sanger, McCune, 2002; Bird, Mabee, 2003; Grande, de Pinna, 2004; Grande, Young, 2004; Hoffmann, 2006; Hoffmann, Britz, 2006; Bird, Hernandez, 2007; Diogo, 2009).

Число и степень развития многих сериальных скелетных элементов рыб, к которым можно отнести и структуры ВА, зависят от темпов и сроков их онтогенеза (Воскобойникова, 2001; Shkil et al., 2012), в значительной степени определяемых эндокринной системой. Даже небольшие изменения активности эндокринных осей могут вызывать значительные изменения хода онтогенеза и приводить к серьезным морфологическим последствиям. При этом важнейшая роль в регуляции онтогенеза рыб отводится гипоталамо-гипо-

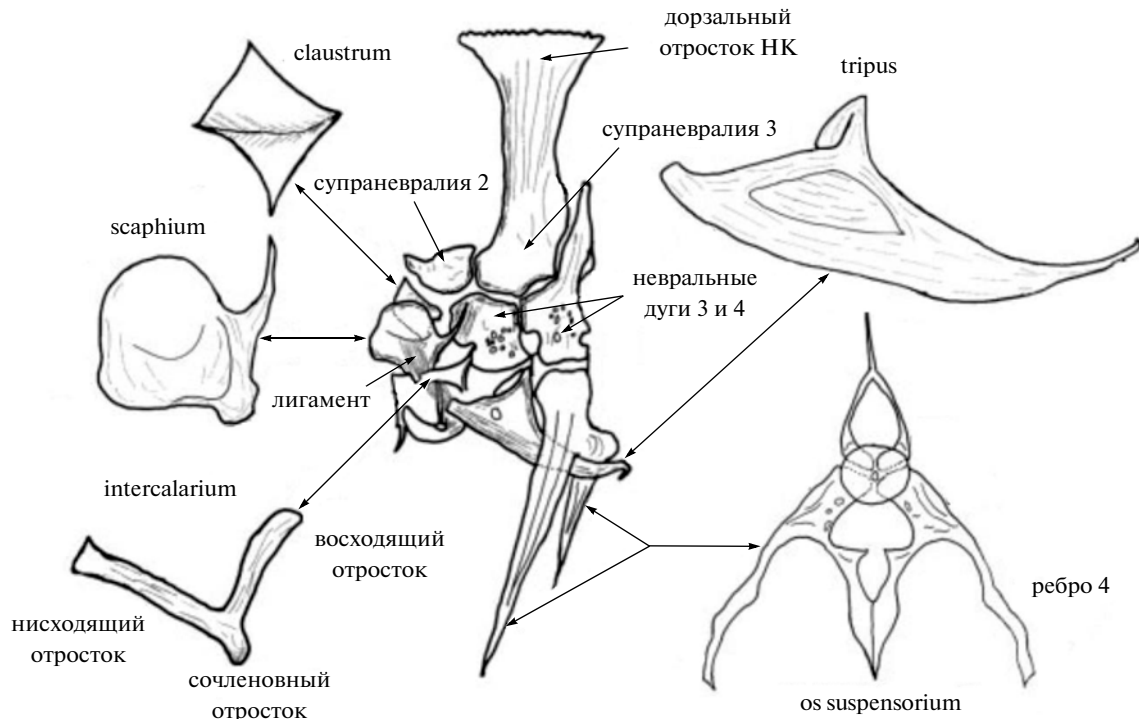


Рис. 1. Морфология Веберова аппарата карповых рыб (Cyprinidae) и его элементов (из Bird, Hernandez, 2007, с изменениями).

физарно-тиреоидной оси (ГГТО) (Janz, 2000). Было установлено, что изменения уровня тиреоидных гормонов (ТГ) на ранних этапах развития рыб влияют на темпы и сроки многих онтогенетических процессов, в том числе, на развитие скелета. Временные характеристики развития многих скелетных структур (кости черепа, чешуйный покров, плоточные зубы и т.д.) находятся под контролем ГГТО (Смирнов и др., 2006; Shkil et al., 2010; Лёвин, 2011; Shkil et al., 2012). Однако влияние изменений активности ГГТО на ход развития элементов ВА не изучалось. В связи с этим, целью настоящей работы является изучение влияния изменений уровня ТГ на развитие ВА карповых рыб.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объектов исследования были использованы представители двух подсемейств карповых рыб (Cyprinidae): крупный африканский усач, *Labeobarbus* (= *Barbus*) *intermedius sensu* Banister, 1973 (Barbinae), и полосатый данио, *Danio rerio* (Danioninae).

Оплодотворенная икра усачей была получена от диких производителей, выловленных во время нереста в притоках оз. Тана (Эфиопия) в 2007–2011 гг. Более подробно методы получения и последующей инкубации икры, а также общие условия содержания личинок и молоди усачей изложены в предыдущих работах (Шкиль и др., 2010;

Smirnov et al., 2012). Получение и выращивание потомства *D. rerio* проводилось согласно общепринятым для данного вида методикам, Zebrafish Protocol (<http://www.zfin.org>).

Для оценки влияния изменения уровня ТГ на развитие ВА икру, а затем личинок и молодь обоих видов содержали в нескольких гормональных режимах: 1) контроль (чистая вода); 2) повышенный уровень ТГ, достигаемый за счет добавления в воду щелочного раствора 3,5,3'-трийодтиронина, T_3 (Sigma, USA) до концентрации 1 нг/мл; 3) пониженный уровень ТГ, достигаемый добавлением в воду гойтрогена — тиомочевины (NH_2CSNH_2 , ГОСТ 6344-73) до концентрации 0.02%. Концентрации активных веществ были подобраны опытным путем (Shkil et al., 2012). Остальные условия содержания рыб были одинаковыми.

Ежедневно из каждой экспериментальной группы фиксировалось 5 и более особей в 10% водном растворе формалина. Скелетные структуры зафиксированных рыб окрашивали бескислотным методом, после чего препараты просветляли (Walker, Kimmel, 2007). Просветленные тотальные препараты рыб обрабатывали и фотографировали с помощью стереомикроскопов Leica MS5 и Olympus SZX 7 с присоединенной цифровой фотокамерой Canon 7D.

Во всех экспериментальных группах определялись сроки и последовательность онтогенетиче-

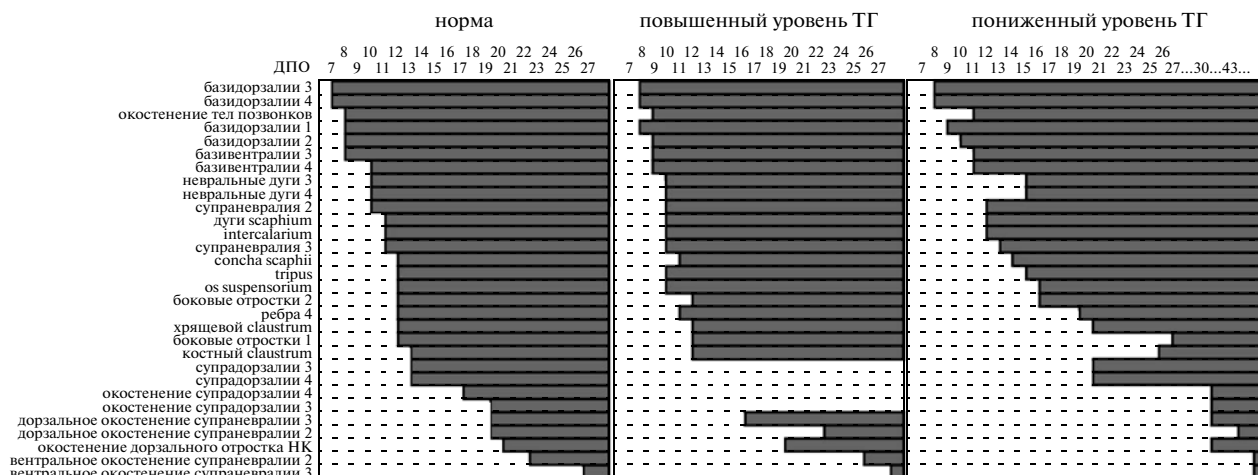


Рис. 2. Последовательности онтогенетических событий в формировании Веберова аппарата *L. intermedius* в различных гормональных режимах.

ских событий в развитии ВА. Под онтогенетическим событием в настоящей работе понимается: появление хряща — окрашивание ткани альцианом синим (Alcian Blue, Sigma, USA); появление кости (оссификация) — окрашивание ткани ализаринном красным (Alizarin Red, Sigma, USA) (Walker, Kimmel, 2007). Временем появления скелетной структуры считается момент, с которого она присутствует у всех рыб в исследуемой экспериментальной группе. Учитывая, что фиксация препаратов осуществлялась ежедневно, для сравнения сроков и темпов онтогенеза ВА в разных гормональных режимах используется число дней, прошедших с момента оплодотворения (дпо). В тексте употребляются обозначения элементов ВА и их частей, принятые в статьях Hoffmann, Britz (2006) и Bird, Hernandez (2007). Под термином “покровное окостенение” подразумевается любое окостенение, не имеющее хрящевого предшественника.

Сравнение частот встречаемости отклонений от нормального развития ВА в экспериментальных группах проводилось с использованием критерия χ^2 , применяемого для анализа различий между долями в крупных выборках (Гланц, 1999). Всего было обработано более 1500 особей *L. intermedius*, полученных в результате пяти скрещиваний, и около 800 особей *D. rerio*, полученных в результате шести скрещиваний.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Реакция структур, входящих в состав *pars auditum*, на изменение уровня ТГ

Scaphium является комплексной структурой, состоящей из модифицированной невральная дуги первого позвонка и покровного окостенения — раковины скафиума (*soncha scaphii*). Развитие

scaphium в нормальных условиях у *D. rerio* происходит по сценарию, ранее подробно описанному (Bird, Mabee, 2003; Grande, Young, 2004). Наши наблюдения в целом совпадают с этими описаниями (рис. 3). Последовательность онтогенетических событий в развитии *scaphium* у *L. intermedius* сходна с таковой у *D. rerio* (рис. 2, 3).

При выращивании усачей в различных гормональных режимах не было обнаружено значимых изменений сроков онтогенетических событий и темпов развития *scaphium* и его дефинитивной морфологии. У данио отличия от нормального развития *scaphium* были обнаружены лишь под действием повышенного уровня ТГ. Наблюдалось преждевременное окостенение элементов *scaphium* (рис. 3) и в ряде случаев недоразвитие *soncha scaphii*.

Claustrum, так же как и *scaphium*, является комплексной структурой. Развитие *claustrum* начинается с появления небольшого хряща, расположенного антеровентральнее хрящей НК. Затем перед хрящевым *claustrum* возникает покровное окостенение — костный *claustrum*, во взрослом состоянии частично располагающийся под верхней частью *soncha scaphii*. Гомология и происхождение частей *claustrum* остаются дискуссионным вопросом (Grande, Young, 2004; Hoffmann, 2006; Diogo, 2009).

У *L. intermedius* при повышенном уровне ТГ сроки формирования хрящевого и костного *claustrum* не изменяются (рис. 2). При дефиците ТГ хрящевой и костный *claustrum* появляются значительно позже, чем в норме (рис. 2), однако, эти отклонения от нормального развития не отражаются на дефинитивной морфологии структуры.

У *D. rerio* под действием повышенного уровня ТГ хрящевой *claustrum* не формируется. Костный *claustrum* появляется раньше, чем в норме (рис. 3).

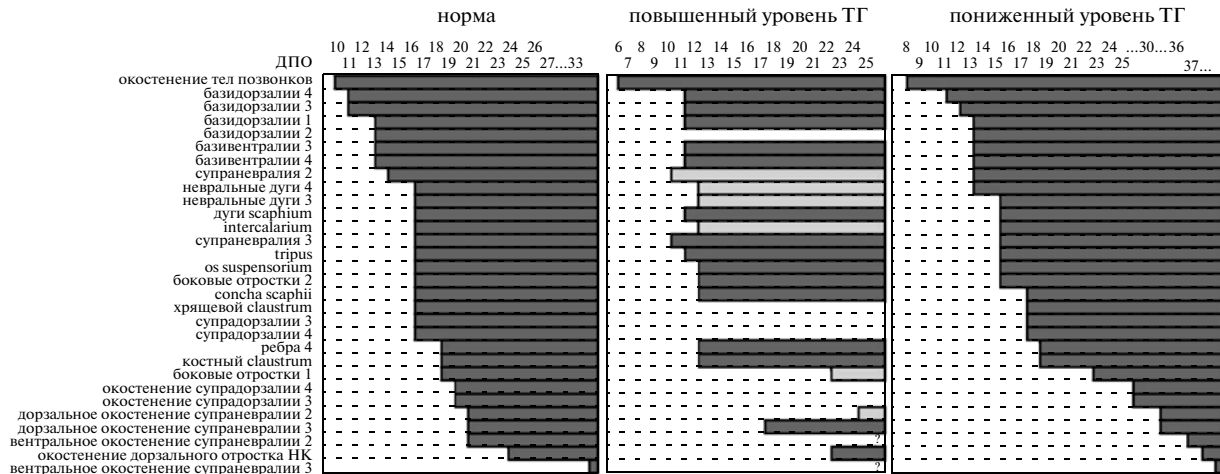


Рис. 3. Последовательности онтогенетических событий в формировании Веберова аппарата *D. rerio* в различных гормональных режимах (светло-серым цветом отмечены те события, которые происходят не у всех особей, срок их наступления определен по первому обнаружению; вопросительными знаками отмечены те события, которые невозможно было отследить из-за деформации структуры).

В ряде случаев костный claustrum не достигает своих нормальных размеров и сливается с верхней частью scaphium (табл. 1, рис. 4). Дефицит ТГ не вызывает значимых изменений сроков появления, темпов онтогенеза и дефинитивной морфологии данной структуры.

Intercalarium является видоизмененной невралью дугой второго позвонка. Он состоит из трех отростков – восходящего, сочленовного и нисходящего (Grande, Young, 2004) (рис. 1, 5a). Развитие intercalarium начинается с появления хрящевой базидорзалии 2, будущего сочленовного отростка. Базидорзалия также дает начало хря-

щевому восходящему отростку, который затем оссифицируется. В месте отхождения восходящего отростка от базидорзалии появляется покровное окостенение, разрастающееся в нисходящий отросток, дистальный конец которого расположен в лигаменте, соединяющем scaphium и tripus. Одновременно с появлением мембранного окостенения начинается оссификация базидорзалии 2.

У усачей сроки появления хрящевой базидорзалии 2 в разных гормональных режимах почти не различаются (рис. 2). Однако изменение уровня ТГ может приводить к изменениям в дефинитивной морфологии intercalarium (табл. 1). Так, по-

Частоты встречаемости отклонений от нормального развития структур Веберова аппарата в экспериментальных группах ($N = 50$, особи в возрасте 25 дпо и старше, различия между нормой и другими гормональными режимами статистически значимы – $p < 0.001$; * – уровень значимости $p < 0.02$; ** – уровень значимости $p < 0.002$)

Признак	<i>L. intermedius</i>		<i>D. rerio</i>	
	норма	эксперимент	норма	эксперимент
Повышенный уровень ТГ				
Отсутствие супрадорзалий третьего позвонка	0.00	0.86	0.00	0.96
Отсутствие супрадорзалий четвертого позвонка	0.00	0.86	0.00	1.00
Редукция intercalarium	0.00	0.14*	0.00	0.88
Слияние claustrum с дугой scaphium	0.00	0.00	0.00	0.56
Отсутствие бокового отростка 1	0.00	0.00	0.00	0.40
Отсутствие супраневральной 2	0.00	0.00	0.00	0.24
Отсутствие невральных дуг третьего позвонка	0.00	0.00	0.00	0.50
Отсутствие невральных дуг четвертого позвонка	0.00	0.00	0.00	0.22**
Пониженный уровень ТГ				
Разрастание intercalarium	0.00	1.00	0.00	1.00
Наличие супрадорзалий у дуг пятого позвонка	0.00	0.00	0.24	0.98

вышенный уровень ТГ может вызывать недоразвитие восходящего отростка (Shkil et al., 2012), а дефицит ТГ вызывает разрастание покровного окостенения между восходящим и нисходящим отростками. В результате *intercalarium* приобретает треугольную форму, отличную от нормальной.

У большинства особей *D. rerio* под действием повышенного уровня ТГ базидорзалия 2 не появляется, и, как следствие, не формируются восходящий и сочленовный отростки. При этом в лигаменте, соединяющем *scaphium* и *tripus*, на месте дистального конца нисходящего отростка формируется небольшое покровное окостенение (табл. 1, рис. 5б). Появление этого окостенения происходит раньше, чем появляется нисходящий отросток у рыб, выращиваемых в нормальных условиях (рис. 3). В некоторых случаях у рыб, развивавшихся в условиях повышенного уровня ТГ, происходит полная утрата *intercalarium*. Дефицит ТГ не приводит к изменению сроков появления базидорзалии 2 и восходящего отростка (рис. 3), но вызывает разрастание покровного окостенения между восходящим и нисходящим отростками и/или разрастание окостенения дистального конца нисходящего отростка в лигаменте, что, в итоге, отражается на дефинитивной морфологии *intercalarium* (табл. 1, рис. 5в).

Трипус является комплексной структурой, состоящей из хрящевой базивентральной 3, которая образует сочленовный и трансформаторный (контактирующий с плавательным пузырем) отростки, и покровного окостенения, формирующего передний отросток.

У усачей повышенный уровень ТГ значимо не изменяет сроки появления базивентральной и начала формирования покровного окостенения. Дефицит ТГ приводит к более позднему началу формирования *tripus* (рис. 2). У данио повышенный уровень ТГ вызывает преждевременные по сравнению с нормой появления базивентральной 3 и оссификацию *tripus* в целом (рис. 3). Дефицит ТГ не оказывает существенного влияния на сроки начала формирования *tripus*. У обоих видов исследуемых рыб изменения уровня ТГ не сказываются на дефинитивной морфологии данного элемента ВА.

Реакция структур, входящих в состав pars sustentaculum, на изменение уровня ТГ

Тела позвонков. Начало оссификации тел позвонков — одно из первых событий в онтогенезе ВА усачей и данио (рис. 2, 3). У усачей при повышенном и пониженном уровнях ТГ наблюдалось незначительное запаздывание начала оссификации тел позвонков относительно нормального развития (рис. 2). У данио, напротив, любое изменение уровня ТГ приводит к раннему началу оссификации (рис. 3). Однако эти изменения не

сказываются на дефинитивной морфологии тел позвонков у обоих исследуемых видов.

Боковые отростки первого позвонка — небольшие костные выросты, расположенные перпендикулярно вентро-латеральной поверхности тела позвонка. При развитии усачей в условиях повышенного уровня ТГ не было обнаружено значимых отклонений от нормы во времени появления и в дефинитивной морфологии данных структур. Под действием гойтрогена боковые отростки появляются значительно позже, чем при нормальном развитии, что, однако, не сказывается на их дефинитивной морфологии (рис. 2).

У большинства особей *D. rerio* в условиях повышенного уровня ТГ боковые отростки первого позвонка не появляются вообще или появляются существенно позже, чем при нормальном развитии (табл. 1, рис. 3). Запаздывание появления данных структур отмечено и при дефиците ТГ (рис. 3). Однако эти изменения сроков не сказываются на их дефинитивной морфологии.

Боковые отростки второго позвонка — костные выросты, расположенные на вентро-латеральной поверхности позвонка. У обоих видов не наблюдается отклонений от нормального развития данных структур при содержании рыб в разных гормональных режимах, несмотря на незначительные флуктуации времени появления этих элементов (рис. 2, 3).

Os suspensorium и ребра четвертого позвонка — костные элементы, отходящие от одного парапофиза, производного хрящевой базивентральной 4. У усачей повышенный уровень ТГ не влияет на сроки появления данных структур. В то же время, дефицит ТГ приводит к их более позднему, в сравнении с нормой, появлению (рис. 2). У данио при повышенном уровне ТГ наблюдается преждевременное начало формирования данных структур, а дефицит ТГ не вызывает существенных сдвигов в сроках их появления (рис. 3). Изменения уровня ТГ не влияют на дефинитивную морфологию *os suspensorium* и ребер четвертого позвонка рыб обоих видов.

Невральный комплекс (НК) и ассоциированные с ним дуги третьего и четвертого позвонков. НК формируется над спинномозговым каналом на уровне позвонков 2–4 из хрящевых супраневральных 2–3 и парных хрящевых супрадорзалий 3–4 (рис. 6а) (Hoffmann, Britz, 2006). Затем в НК появляются семь центров оссификации: два — на дорзальной поверхности супраневральных 2 и 3; один — на вентральной поверхности супраневральной 3; остальные центры связаны с парными супрадорзалиями 3 и 4. Кроме того, в контрольных группах обоих видов отмечена кальцинация вентральной поверхности супраневральной 2, которая, возможно, является независимым восьмым центром оссификации НК.

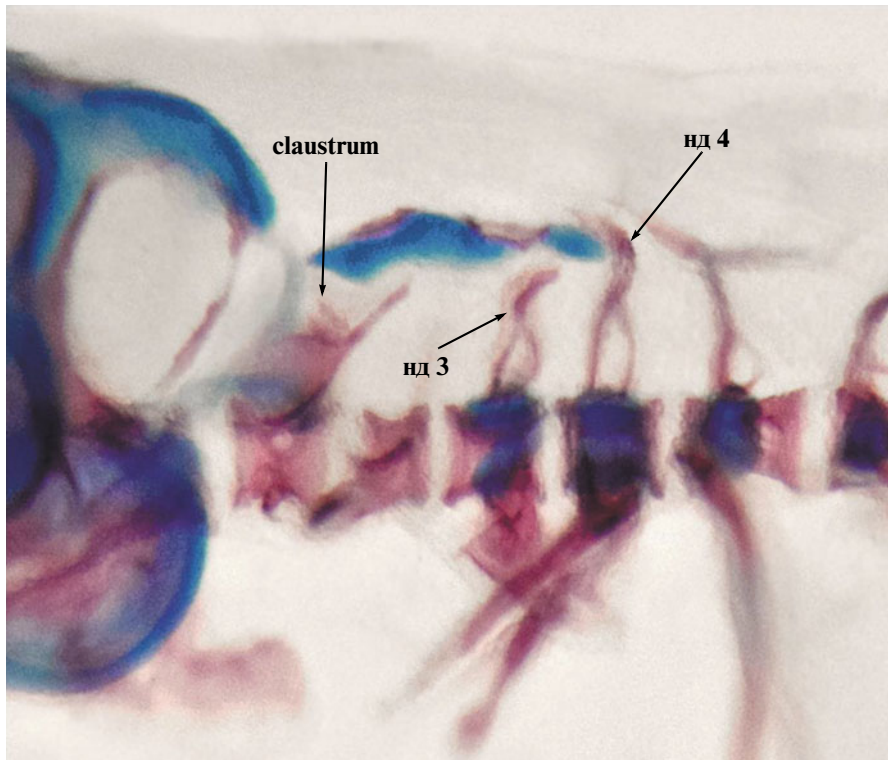


Рис. 4. Элементы Веберова аппарата *D. rerio* при повышенном уровне ТГ, возраст 22 дпо. Обозначения: нд 3 – невральная дуга третьего позвонка, нд 4 – невральная дуга четвертого позвонка.

У усачей при повышенном уровне ТГ наблюдается преждевременная оссификация дорзальной части супраневральной 3 и более позднее, чем в норме, начало оссификации супраневральной 2 (рис. 2). Зачастую не появляются супрадорзалии, ассоциированные с невральными дугами третьего и четвертого позвонков (табл. 1). Это приводит к недоразвитию хрящевого НК и к сокращению числа центров окостенения НК до трех/четырех, связанных с супраневральными 2 и 3 (рис. 6б). Также изменяется форма дуг третьего и четвертого позвонков – отсутствует характерное разрастание оснований этих дуг. В результате, четвертая дуга приобретает дефинитивную морфологию, сходную с пятой и последующими невральными дугами позвоночника.

В условиях дефицита ТГ структуры НК реагируют значительной задержкой времени появления и начала оссификации (рис. 2). У многих рыб после формирования супраневральных 2–3 на уровне второго позвонка появляются дополнительные парные хрящи, несвязанные с супрадорзалиями 3 (рис. 6в). При этом супрадорзалии 3 остаются недоразвитыми. Также зафиксирован случай образования задней части НК не из одного хряща – супраневральной 3, как при нормальном развитии, а из двух (рис. 6г). Однако все вышеперечисленные изменения, вызванные дефицитом

ТГ, не оказывают существенного влияния на дефинитивную морфологию НК усачей.

У данио повышенный уровень ТГ приводит к многочисленным изменениям в онтогенезе НК (табл. 1; рис. 3, 7а–в): у ряда особей не образуется супраневральная 2 (рис. 7а); если появляются обе супраневральные, то существенно раньше, чем в норме (рис. 7б); зачастую не формируются супрадорзалии 3–4 и связанные с ними центры оссификации (рис. 4); могут отсутствовать невральные дуги третьего и/или четвертого позвонков; иногда появляются независимые покровные окостенения над базидорзалиями, которые могут формировать несвязанный с невральными дугами остистый отросток на уровне позвонка 4 (рис. 7в). Эти изменения приводят к недоразвитию НК и к сокращению числа центров оссификации до трех/четырех, а иногда, в случае потери супраневральной 2, и двух. Начало кальцинации супраневральной 3 при повышенном уровне ТГ сдвинуто на более ранний срок, тогда как оссификация супраневральной 2 происходит позже, чем в норме (рис. 3).

Дефицит ТГ значимо не влияет на сроки появления хрящевых элементов НК, но наблюдается значительное запаздывание относительно нормы начала их оссификации (рис. 3). Несмотря на это, НК формируется без видимых нарушений.

Под действием гойтрогена происходит ряд изменений и в развитии следующих за ВА пятого и шестого позвонков. Традиционно полагают, что у карповых рыб позвонки, не входящие в состав ВА, лишены супрадорзалий (Hoffmann, Britz, 2006). Однако, большинство выращенных при дефиците ТГ особей *D. rerio* имеют хрящевые супрадорзалии на пятом, а некоторые и на шестом позвонках (табл. 1). Эти супрадорзалии в ходе развития могут сливаться над спинномозговым каналом между собой и с НК. При этом оссификация невральных дуг пятого и шестого позвонков развивается так же, как и в невральных дугах третьего и четвертого позвонков, входящих в состав ВА. Изменяется также процесс оссификации супрадорзалий четвертого позвонка — он может распространяться не только вперед и вверх, как в норме, но и в каудальном направлении. В результате форма невральных дуг четвертого позвонка уподобляется форме дуг третьего позвонка (рис. 7г, д). Необходимо отметить, что у части особей контрольной группы *D. rerio* также были отмечены хрящевые супрадорзалии на невральных дугах пятого позвонка (табл. 1). Однако случаев слияния этих супрадорзалий с НК и изменений оссификации невральных дуг четвертого и пятого позвонков обнаружить не удалось.

Кроме того, в единичных случаях у *D. rerio*, выращенных в условиях дефицита ТГ, появляется небольшой хрящ над задней частью НК впереди от остистого отростка 4, по форме и положению похожий на часть супраневральной дуги (рис. 7д).

ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные данные свидетельствуют, что *pars sustentaculum* является более чувствительной к изменению уровня ТГ частью ВА, чем *pars auditum*, т.к. основной функциональный канал связи между внутренним ухом и плавательным пузырем сохраняется у рыб во всех экспериментальных группах. При этом в состав обеих частей ВА входят структуры, различающиеся по степени ТГ-реактивности *sensu* Шкиль и Смирнов (2009). Тела позвонков, боковые отростки второго позвонка, *tripus*, *os suspensorium* и ребра четвертого позвонка не демонстрируют выраженной реакции на изменение уровня ТГ у обоих видов. Невральные дуги 3 реагируют только на повышение уровня ТГ у обоих видов. Боковые отростки первого позвонка, *claustrum*, *scaphium* реагируют на повышение уровня ТГ только у данио. НК и *intercalarium* обоих видов в той или иной степени отвечают на любое отклонение уровня ТГ от нормы.

Характер реакции структур на изменение уровня гормона также различается. У ряда элементов ВА (например, супраневральной 2–3, костная часть *claustrum* у *D. rerio*) в ответ на изменение уровня гормона значимо сдвигаются сроки появ-

ления (рис. 2, 3), что в дальнейшем отражается на их дефинитивной морфологии. У других — не происходит изменений сроков появления, но изменяются темпы и продолжительность дифференцировки. В частности, сроки появления базидорзалии 2 (если она формируется) одинаковы в разных гормональных режимах, но темпы и сроки ее дальнейшего развития, и темпы и сроки развития связанного с ней и ее производными покровного окостенения, по всей видимости, изменяются, что отражается на дефинитивной морфологии *intercalarium* (рис. 5).

Необходимо отметить, что разные отделы *intercalarium* по-разному реагируют на изменение уровня гормона. Развитие восходящего, сочленовного отростков и проксимальной части нисходящего отростка зависят от уровня ТГ. В то же время дистальная часть нисходящего отростка, связанная с лигаментом, формируется в различных гормональных режимах, даже в отсутствие остальных частей *intercalarium*. Это различие в ТГ-реактивности может рассматриваться как косвенное свидетельство в пользу ранее выдвинутой гипотезы о двойном происхождении этого элемента ВА — из видоизмененной дуги второго позвонка и из окостенения лигамента (Diogo, 2009).

Также было установлено, что некоторые гомологичные структуры, входящие в состав ВА, имеют разную ТГ-реактивность. Так, у данио боковые отростки первого позвонка реагируют на повышенный уровень ТГ, у усачей — только на дефицит ТГ. В то же время, боковые отростки второго позвонка обоих видов слабо реагируют на изменения уровня ТГ. У усачей развитие производной невральной дуги первого позвонка, *scaphium*, не зависит от уровня ТГ, в отличие от невральных дуг других позвонков, входящих в состав ВА.

Значительные изменения сроков и темпов развития одних структур при относительном постоянстве сроков и темпов развития других в различных гормональных режимах приводят к изменению последовательности онтогенетических событий в ходе формирования ВА (рис. 2, 3). Примером такого формирования с последствиями для дефинитивной морфологии является преждевременное начало формирования НК — появление супраневральной 2 и 3 при развитии данио в условиях повышенной концентрации ТГ.

Были обнаружены межвидовые различия в ТГ-реактивности структур ВА. Так, *claustrum*, *scaphium*, боковые отростки первого позвонка, супраневральной 2–3 у усачей не реагируют на повышение уровня ТГ, в то время как у данио эти структуры отвечают на повышение уровня гормона. Невральные дуги четвертого позвонка у данио реагируют как на повышение, так и на понижение уровня ТГ, тогда как у усачей реакция наблюдается лишь при повышенном уровне ТГ.

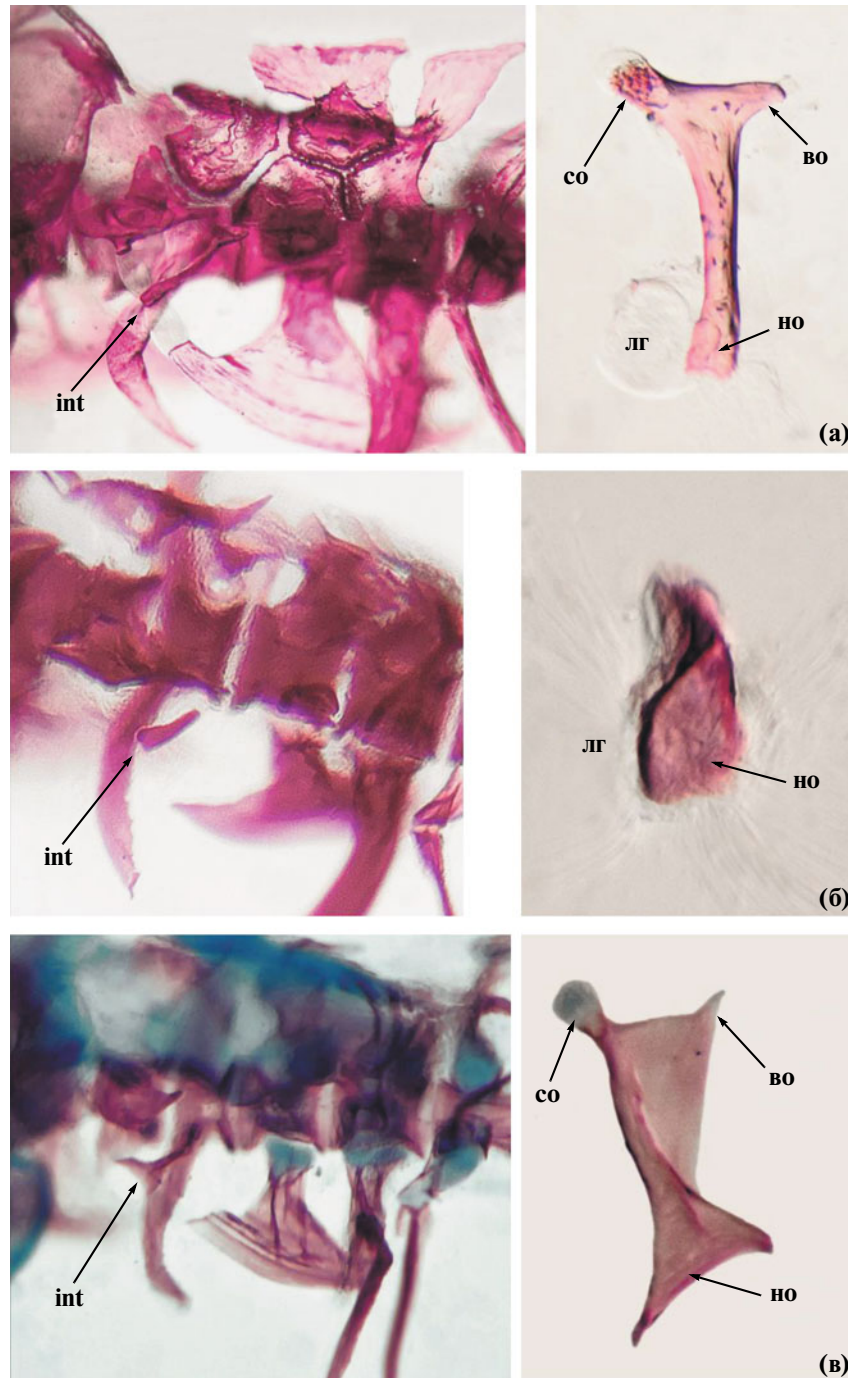


Рис. 5. Intercalarium *D. rerio* в различных гормональных режимах. Слева – тотальный препарат, справа – intercalarium отдельно. (а) контроль (взрослая особь); (б) повышенный уровень ТГ (76 дпо), (в) пониженный уровень ТГ (90 дпо). Обозначения: int – intercalarium, во – восходящий отросток, лг – лигамент, но – нисходящий отросток, со – сочленовный отросток.

В целом, для *D. rerio* характерна более выраженная реакция на экспериментальные изменения уровня гормона. В условиях повышенного уровня ТГ у данио происходит ряд серьезных отклонений от нормального развития (рис. 3). Практически все они связаны с нарушениями развития хрящевых элементов ВА: супраневралий 2–3, базидорзалии 2, хрящевого claustrum и су-

прадорзалий, которые впоследствии приводят к изменениям дефинитивной морфологии ассоциированных с ними костных элементов. Отсутствие базидорзалий 2 при повышенном уровне ТГ влечет значительную редукцию intercalarium – сохраняется только дистальная часть нисходящего отростка, не связанная с телом позвонка (рис. 5б). При отсутствии хрящевого claustrum, его костная

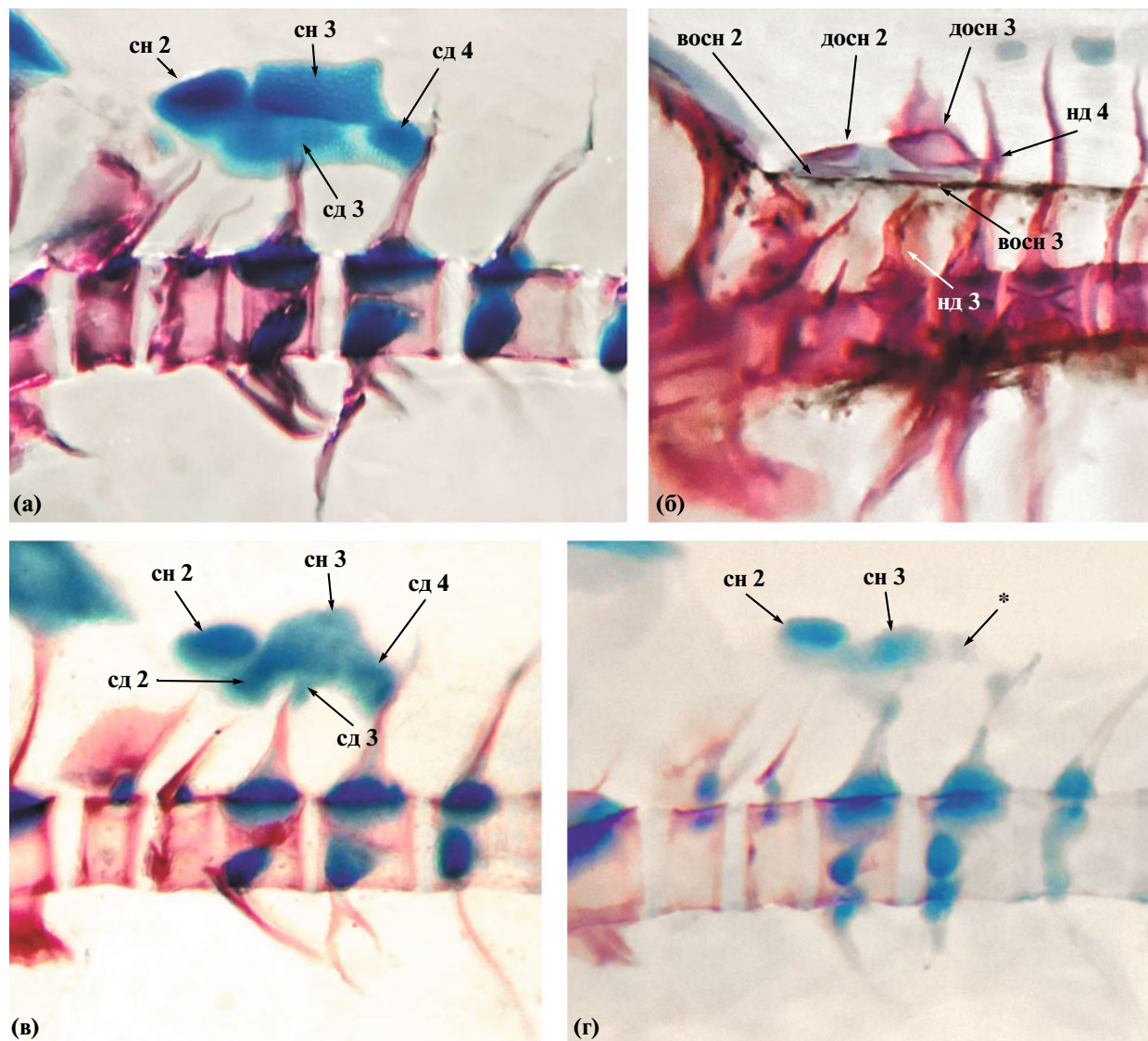


Рис. 6. Невральный комплекс *L. intermedius* в различных гормональных режимах: а) контроль (25 дпо); б) повышенный уровень ТГ (34 дпо); в и г) пониженный уровень ТГ (22 и 17 дпо, соответственно). Обозначения: восн 2 – вентральное окостенение супраневральной 2, восн 3 – вентральное окостенение супраневральной 3, досн 2 – дорзальное окостенение супраневральной 2, досн 3 – дорзальное окостенение супраневральной 3, нд 3 – невральная дуга третьего позвонка, нд 4 – невральная дуга четвертого позвонка, сд 2 – супрадорзалия второго позвонка, сд 3 – супрадорзалия третьего позвонка, сд 4 – супрадорзалия четвертого позвонка, сн 2 – супраневральной 2, сн 3 – супраневральной 3, * – дополнительный хрящевой зачаток НК.

часть развивается раньше, чем в норме (рис. 3), и часто прирастает к верхней части дуги scaphium (рис. 4). Отсутствие супрадорзалий приводит к сильной редукции НК, а также может быть причиной недоразвития соответствующих невральных дуг (рис. 4).

При дефиците ТГ процесс формирования ВА данио протекает значительно дольше, чем в норме (рис. 3). По всей видимости, изменение темпов развития происходит не только в ВА, но и в прилегающих к нему тканях и структурах, что приводит к появлению нехарактерных для этого вида скелетных элементов: супрадорзалий 5–6 (рис. 7г)

и небольшого хряща на уровне четвертого позвонка (рис. 7д). Последний можно трактовать как атавизм четвертой супраневральной, исчезнувшей, по мнению некоторых авторов (Bird, Mabee, 2003), в ходе эволюции карпообразных рыб.

Реакция усачей на изменение уровня ТГ выражена слабее. Повышенный уровень ТГ вызывает изменения в последовательности онтогенетических событий лишь в ходе формирования НК (рис. 2). Дорзальное окостенение супраневральной 3 происходит раньше, чем в норме, за ним следует образование дорзального отростка НК, за которым с задержкой появляется дорзальное окосте-

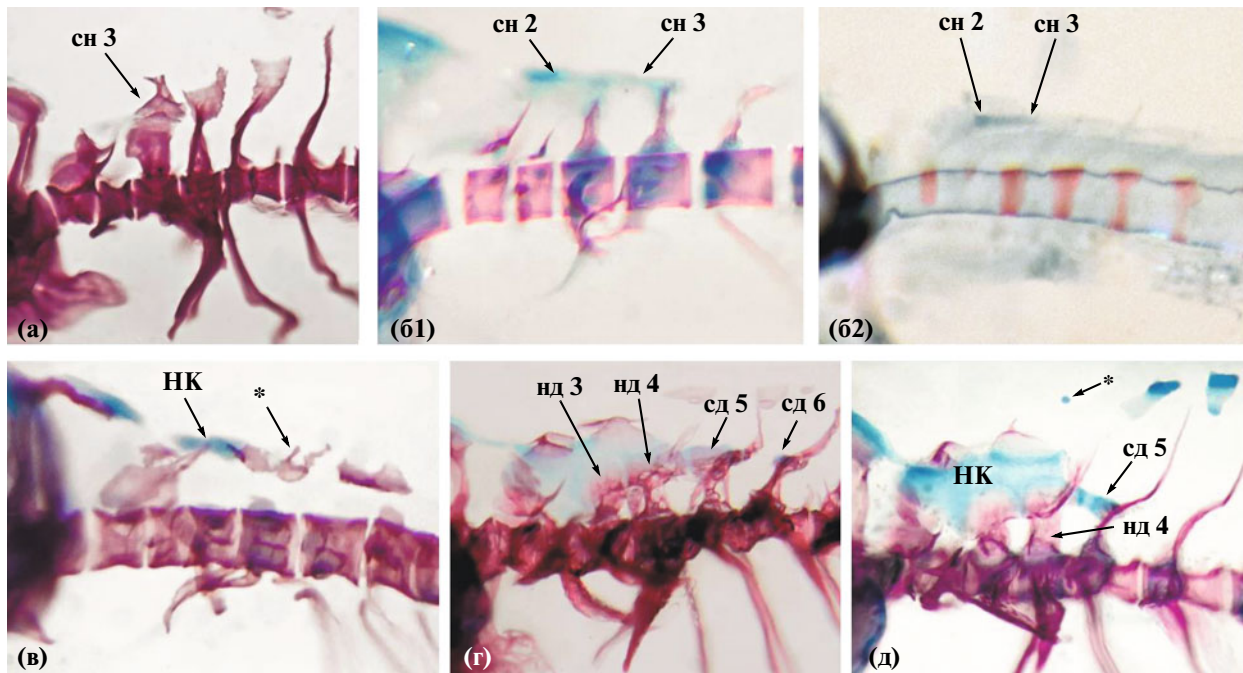


Рис. 7. Варианты строения невралного комплекса *D. rerio* в различных гормональных режимах: (а) повышенный уровень ТГ (47 дпо); (б1) контроль (13 дпо), (б2) повышенный уровень ТГ (7 дпо); (в) повышенный уровень ТГ (20 дпо), * – независимый остистый отросток четвертого позвонка; (г и д) пониженный уровень ТГ (59 и 53 дпо, соответственно), * – дополнительное хрящевое образование на уровне четвертого позвонка. сд 5 – супрадорзалия пятого позвонка, сд 6 – супрадорзалия шестого позвонка. Остальные обозначения как на рисунке 6.

нение супраневральной 2. Супрадорзалии 3 и 4 не образуются у большинства экземпляров, вследствие чего соответствующие дуги не приобретают характерной для них формы, и НК остается сильно редуцированным, представляя собой небольшую пластинку над спинномозговым каналом.

При дефиците ТГ развитие ВА усачей в целом протекает медленнее, чем в норме. Различная ТГ-реактивность структур приводит к нарушению последовательности онтогенетических событий (рис. 2). Несмотря на это, дефинитивная морфология большинства структур ВА усачей, выращенных при дефиците ТГ, практически не отличается от нормальной. Изменения обнаружены в морфологии *intercalarium*, покровное окостенение которого разрастается значительно сильнее, чем в норме. Кроме того, у ряда особей появляются нехарактерные для вида парные хрящи второго позвонка, расположенные на уровне супрадорзалий последующих позвонков (рис. 6в). Эти структуры могут рассматриваться в качестве атавизма утраченных в ходе эволюции супрадорзалий второго позвонка. Обнаруженные также под действием дефицита ТГ два зачатка супраневральной 3 (рис. 6г) могут свидетельствовать в пользу гипотезы о том, что этот элемент исторически имел две составляющие: супраневральной 3 и 4 (Gayet, 1986).

Анализ морфологии молоди обоих видов показал, что даже потомки, полученные в результате

одного скрещивания, имеют различную ТГ-реактивность. Часть рыб демонстрировала яркую реакцию на изменение уровня ТГ, т.е. у них были отмечены практически все вышеперечисленные нарушения развития. У других рыб были обнаружены лишь некоторые отклонения от нормального хода онтогенеза. Единичные особи развивались без видимых нарушений.

Вышеперечисленные факты свидетельствуют в пользу того, что изменения уровня ТГ вызывают гетерохронии в развитии ВА, т.е. приводят к изменению сроков и темпов онтогенетических событий, что отражается на дефинитивной морфологии как отдельных структур, так и ВА в целом (Рэфф, Кофмен, 1986). Большинство структур ВА, изменяющих дефинитивную морфологию в результате индуцированных в эксперименте гетерохроний, широко используются в систематике и филогении *Otophysi* (Watson, 1939; Ramaswami, 1955; Rosen, Greenwood, 1970; Fink, Fink, 1981; Богуцкая, 1991; Coburn, Futey, 1996; Sanger, McCune, 2002; Bird, Mabee, 2003; Grande, de Pinna, 2004; Grande, Young, 2004; Hoffmann, 2006; Hoffmann, Britz, 2006; Bird, Hernandes, 2007; Diogo, 2009). Сходство морфологии отдельных структур ВА карповых рыб, выращенных в разных гормональных режимах, с морфологией тех же структур других представителей *Otophysi* (харацинообразные (*Characiformes*), сомообразные (*Siluriformes*), гимнотообразные (*Gymnotiformes*)) позволяет

предположить участие гетерохроний в формировании разнообразия ВА в пределах Otophysi.

Авторы искренне признательны С.В. Смирнову за всестороннюю помощь и поддержку в ходе исследований и при написании данной статьи. Авторы выражают благодарность координатору Совместной Российско-Эфиопской биологической экспедиции (JERBE) А.А. Даркову, Белаю Абдиссе и другим сотрудникам Bahir-Dar Fishery and Other Aquatic Life Research Center (Эфиопия) за помощь в организации и проведении исследований. Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ 12-04-31923, 13-04-00031 и 14-04-00590.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Богущая Н.Г. Развитие Веберова аппарата в онтогенезе некоторых видов карповых рыб (Cyprinidae) // Вопросы ихтиологии. 1991. Т. 31. Вып. 3. С. 363–372.
- Воскобойникова О.С. Эволюционное значение гетерохроний в развитии костного скелета рыб подотряда Notothenioidei (Perciformes) // Вопросы ихтиологии. 2001. Т. 41. № 4. С. 455–464.
- Гланц С. Медико-биологическая статистика. М., Практика, 1999. 459 с.
- Лёвин Б.А. Об онтогенетических причинах и механизмах формирования различий в числе чешуи у рыб // Онтогенез. 2011. Т. 42. № 3. С. 220–225.
- Рэфф Р., Кофмен Т. Эмбрионы, гены и эволюция. М., Мир, 1986. 404 с.
- Смирнов С.В., Держинский К.Ф., Лёвин Б.А. О зависимости числа чешуй в боковой линии у африканского усача *Barbus intermedius* (Cyprinidae) от скорости онтогенеза (по экспериментальным данным) // Вопросы ихтиологии. 2006. Т. 46. № 1. С. 134–138.
- Шкиль Ф.Н., Борисов В.Б., Абдисса Б. и др. Роль гормона щитовидной железы в онтогенезе и морфологической диверсификации *Barbus intermedius sensu Banister*, 1973 озера Тана, Эфиопия // Онтогенез. 2010. Т. 41. № 6. С. 438–450.
- Шкиль Ф.Н., Смирнов С.В. Тиреоидная реактивность большого африканского усача *Labeobarbus intermedius* (Teleostei, Cyprinidae): индивидуальная изменчивость и ее морфологические последствия // Доклады академии наук. 2009. Т. 425. № 2. С. 283–285.
- Bird N.C., Hernandez L.P. Morphological variation in the Weberian apparatus of Cypriniformes // Journal of Morphology. 2007. V. 268. P. 739–757.
- Bird N.C., Mabee P.M. Developmental morphology of the axial skeleton of the zebrafish, *Danio rerio* (Ostariophysi: Cyprinidae) // Developmental Dynamics. 2003. V. 228. P. 337–357.
- Chardon M., Vandewalle P. Evolutionary trends and possible origin of the Weberian apparatus. Netherlands Journal of Zoology. 1996. V. 47. № 4. P. 383–403.
- Coburn M.M., Futey L.M. The ontogeny of supraneurals and neural arches in the cypriniform Weberian Apparatus (Teleostei: Ostariophysi) // Zoological Journal of the Linnean Society. 1996. V. 116. P. 333–346.
- Diogo R. Origin, evolution and homologies of the Weberian apparatus: a new insight // International Journal of Morphology. 2009. V. 27. P. 333–354.
- Fink S.V., Fink W.L. Interrelationships of the ostariophysan fishes (Teleostei) // Zoological Journal of the Linnean Society. 1981. V. 72. P. 297–353.
- Gayet M. About ostariophysan fishes: a reply to S.V. Fink, P.H. Greenwood, and W.L. Fink's criticism. Bulletin du Muséum National d'Histoire Naturelle. Paris. Secteur C 8. 1986. P. 393–409.
- Grande T., de Pinna M. The evolution of the Weberian apparatus: a phylogenetic perspective. In: Arratia, G., Tintori A. (eds.). Mesozoic Fishes: Systematics and Biodiversity. Verlag Pfeil, 2004. P. 429–448.
- Grande T., Young B. The ontogeny and homology of the Weberian apparatus in the zebrafish *Danio rerio* (Ostariophysi: Cypriniformes) // Zoological Journal of the Linnean Society. 2004. V. 140. P. 241–254.
- Hoffmann M. Ontogeny and homology of the neural complex and the claustrum of otophysan Ostariophysi (Actinopterygii: Teleostei): Dissertation der Fakultät für Biologie, der Eberhard Karls Universität Tübingen zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften, 2006. 169 p.
- Hoffmann M., Britz R. Ontogeny and homology of the neural complex of otophysan Ostariophysi // Zoological Journal of the Linnean Society. 2006. V. 147. P. 301–330.
- Janz D.M. Endocrine system. In: Ostrand G.K. (ed.). The laboratory fish. London, Academic Press, 2000. P. 189–217.
- Ramaswami L.S. Skeleton of Cyprinoid fishes in relation to phylogenetic studies. 7. The skull and Weberian apparatus of Cyprininae (Cyprinidae) // Acta Zoologica. 1955. Bd. XXXVI. P. 199–242.
- Rosen D.E., Greenwood P.H. Origin of the Weberian apparatus and the relationships of the Ostariophysan and Gonorynchiform fishes // American Museum Novitates. 1970. № 2428. P. 1–25.
- Sanger T.J., McCune A.R. Comparative osteology of the *Danio* (Cyprinidae: Ostariophysi) axial skeleton with comments on *Danio* relationships based on molecules and morphology // Zoological Journal of the Linnean Society. 2002. V. 135. P. 529–546.
- Shkil F.N., Kapitanova D.V., Borisov V.B. et al. Thyroid hormone in skeletal development of cyprinids: effects and morphological consequences // Journal of Applied Ichthyology. 2012. V. 28. P. 398–405.
- Shkil F.N., Levin B.A., Abdissa B. et al. Variability in the number of tooth rows in the pharyngeal dentition of *Barbus intermedius* (Teleostei; Cyprinidae): genetic, hormonal and environmental factors // Journal of Applied Ichthyology. 2010. V. 26. P. 315–319.
- Smirnov S.V., Kapitanova D.V., Borisov V.B. et al. Lake Tana large barbs diversity: developmental and hormonal bases // Journal of Ichthyology. 2012. Vol. 52. № 11. P. 861–880.
- Walker M.B., Kimmel C.B. A two-color acid-free cartilage and bone stain for zebrafish larvae // Biotechnic & Histochemistry. 2007. V. 82. P. 23–28.
- Watson J.M. The development of the Weberian ossicles and anterior vertebrae in the goldfish // Proceedings of the Royal Society of London. Series B. 1939. V. 127. P. 452–472.

Effects of Thyroid Hormone Level Alterations on the Weberian Apparatus Ontogeny of Cyprinids (Cyprinidae; Teleostei)

D. V. Kapitanova^{a, b} and F. N. Shkil^{a, b}

^a*Koltzov Institute of Developmental Biology RAS, Vavilova str., 26, Moscow, 119334 Russia*

^b*Severtsov Institute of Ecology and Evolution RAS, Leninsky prosp., 33, Moscow, 119071 Russia*

e-mail: daryakapitanova@gmail.com

Received January 22, 2014; in final form, May 29, 2014

Abstract—Effects of thyroid hormone (TH) level alterations on the development and definitive morphology of the Weberian apparatus (WA, morphofunctional complex, providing transmission of sound signals from the gas bladder to the labyrinth of inner ear) were experimentally assessed in cyprinid fishes (*Labeobarbus intermedius* and *Danio rerio*). Alterations of TH—level were shown to lead to heterochronies, changes of timing and rates of ontogeny events resulting in changes of definitive morphology of some structures as well as of the WA as a whole. Differences in reaction of WA structures to the TH—level alterations, and inter— and intraspecific variability of TH—responsiveness were revealed.

Keywords: Weberian apparatus, thyroid hormones, cyprinids, heterochronies