

С. Я. ТУЧКОВА, Л. В. ЧЕРКАСОВА

**АВТОРАДИОГРАФИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СИНТЕЗА ДНК  
И МИТОТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПРИ ВОССТАНОВЛЕНИИ  
РЕГЕНЕРАЦИОННОЙ СПОСОБНОСТИ КОНЕЧНОСТЕЙ  
У БЕСХВОСТЫХ АМФИБИЙ**

*(Представлено академиком Д. К. Беляевым 11 XII 1973)*

Утрата регенерационной способности конечностей у бесхвостых амфибий в ходе метаморфоза сопровождается снижением в тканях конечностей интенсивности синтеза ДНК и митотической активности (<sup>4</sup>, <sup>6</sup>). Наряду с этим установлено, что при гистологической дифференцировке тканей мезодермального происхождения конечностей повышается синтез белка и что этот процесс обуславливает, возможно, утрату регенерационной способности конечностей у этого вида животных (<sup>5</sup>).

В работах (<sup>2</sup>, <sup>3</sup>) показана возможность восстановления регенерационной способности конечностей, утраченной в ходе метаморфоза головастика у бесхвостых амфибий путем дополнительной травматизации, вызывающей резкое усиление процессов разрушения и дедифференцировки тканей остатка органа и образование регенерационной blastемы.

Цель настоящей работы — исследовать изменения синтеза ДНК и митотической активности в тканях мезодермального происхождения конечностей у бесхвостых амфибий в процессе восстановления их регенерационной способности.

Опыты ставили на головастиках травяной лягушки *Rana temporaria*, собранных в холодном ручье на Кропотовской биологической станции в Подмосковье, на стадии IIa по Л. Я. Бляхеру (<sup>1</sup>). У 50 головастиков под эфирным наркозом ампутировали обе задние конечности на уровне проксимальной трети голени. Левая конечность служила контролем, правую конечность дополнительно травматизировали путем нанесения на раневую поверхность 20 проколов иглой, диаметром 1,4 мм, в дисто-проксимальном направлении, до основания конечности. Фиксацию обеих задних конечностей производили через 1, 3, 5 и 7 дней после ампутации по 3—7 животных на срок в жидкости Карнуа.  $H^3$ -тимидин с удельной активностью 4,5 С/ммоль вводили за 2 часа до фиксации внутрибрюшинно, в дозе 2 мкС в 0,1 мл дистиллированной воды. Парафиновые срезы толщиной 5 мкм покрывали жидкой фотоэмульсией типа «М» и экспонировали при температуре 4° в течение 4 недель, после проявления окрашивали гематоксилин-эозином. На автографах подсчитывали процент меченых клеток — индекс метки — в различных тканях конечности и митотический индекс — число митозов на 100 клеток. Мечеными считали клетки, содержащие не менее 10 зерен серебра над ядрами. Индекс метки и митотический индекс определяли при подсчете 500—1000 ядер каждой изучаемой ткани у животного. Для определения каждого из выбранных показателей использовали материал от 3—6 животных. Цифровые данные статистически обрабатывали по Фишер — Стьюденту.

У головастиков на стадии IIa регенерационная способность конечностей утрачивается: по данным (<sup>3</sup>) она отсутствует после ампутации в проксимальной части голени в 57,4% случаев, а в наших опытах на 100 животных — в 56% случаев. При фиксации для автордиографического исследования на поздних сроках после ампутации и травматизации брали случаи с регенерирующими правыми, дополнительно травмированными, и нерегенерирующими левыми конечностями. При фиксации в ранние сроки, через 1—3 дня после ампутации, результат можно было определить только микроскопически на срезах.

Интактные конечности головастиков на стадии IIa развиты слабо: бедро и голень их образуют тупой угол. Ткани мезодермального происхождения дифференцированы еще не полностью: наряду с дифференцированными мышечными волокнами в бедре и голени сохраняются недифференцированные миелинные элементы; вокруг хрящевых диафизов костей бедра и голени образуется костная оболочка. Н<sup>3</sup>-тимидин включается довольно интенсивно в мышечную ткань (индекс метки 22,2, митотический индекс 1,5), в эпифизарный хрящ (индекс метки 25,2, митотический индекс 2,0) и в слабой степени в диафизарный хрящ (соответствующие индексы 4,2 и 0,2).

После ампутации конечностей на стадии IIa, если происходит их регенерация, то она протекает сходным образом, как на стадии Ia. При отсутствии регенерации конечностей на данной стадии на ампутиционной раневой поверхности образуется только соединительнотканый рубец. На рис. 1А, а представлены результаты подсчетов индекса метки, на рис. 1А, б — данные о митотическом индексе в тканях мезодермального происхождения регенерирующих конечностей после ампутации на стадии IIa. Через сутки после ампутации обе величины существенно не изменяются по сравнению с уровнем их в интактной конечности на стадии IIa. В последующие сроки опыта происходит параллельное снижение обеих величин. Через 3 дня после ампутации в дистальной части культи формируется соединительнотканый рубец, клетки которого характеризуются высокими показателями индексов метки и митоза. Падение синтетической активности ДНК в тканях нерегенерирующей конечности связано с дальнейшей их дифференцировкой в процессе метаморфоза головастиков. Через 5—7 дней после ампутации все элементы мышечной ткани дифференцированы и уровень включения в них Н<sup>3</sup>-тимидина достоверно ниже, чем через 1—3 дня после ампутации ( $P < 0,05$ ). В эпифизарном хряще снижение обоих показателей менее выражено, поскольку рост конечности не заканчивается в поздние сроки опыта.

После ампутации и дополнительной травматизации конечности на стадии IIa культи резко гиперемированы. Ткани мезодермального происхождения сильно разрушены и в них обнаруживаются признаки дедифференцировки. Регенерация конечности происходит через 10—12 дней и может быть полной или частичной, т. е. с образованием неполного числа пальцев или атипичных органов.

На рис. 1Б представлены данные подсчета индекса метки и митотического индекса в тканях мезодермального происхождения, регенерирующих после травматизации конечностей. Через сутки после ампутации и дополнительной травматизации уровни включения Н<sup>3</sup>-тимидина и митотической активности в тканях мезодермального происхождения не отличаются от соответствующих показателей в интактной конечности и дополнительно не травмированной левой конечности.

Через 3 дня после ампутации происходит значительное накопление клеток в регенерационной бластеме, которые интенсивно включают Н<sup>3</sup>-тимидин; в остальных тканях мезодермального происхождения индекс метки и митотический индекс не изменяются по сравнению с уровнем в предшествующий срок опыта, но они значительно выше, чем в левых нерегенерирующих конечностях.

Через 5—7 дней после ампутации и травматизации образуется регенерат на стадии конуса. Процессы разрушения и дедифференцировки в тканях достигают максимума и характеризуются подъемом ДНК-синтезирующей и митотической активностей в мышечной ткани, диафизарном хряще и клетках бластемы.

Итак, уровень синтеза ДНК и митотический индекс тканей мезодермального происхождения в интактных конечностях у головастиков в процессе утраты ими регенерационной способности при переходе от стадии Ibc к стадии IIa не понижаются, понижение происходит позже на стадии IIIa (4). После ампутации конечностей на стадии IIa, когда они не регенерируют, их ткани мезодермального происхождения практически не

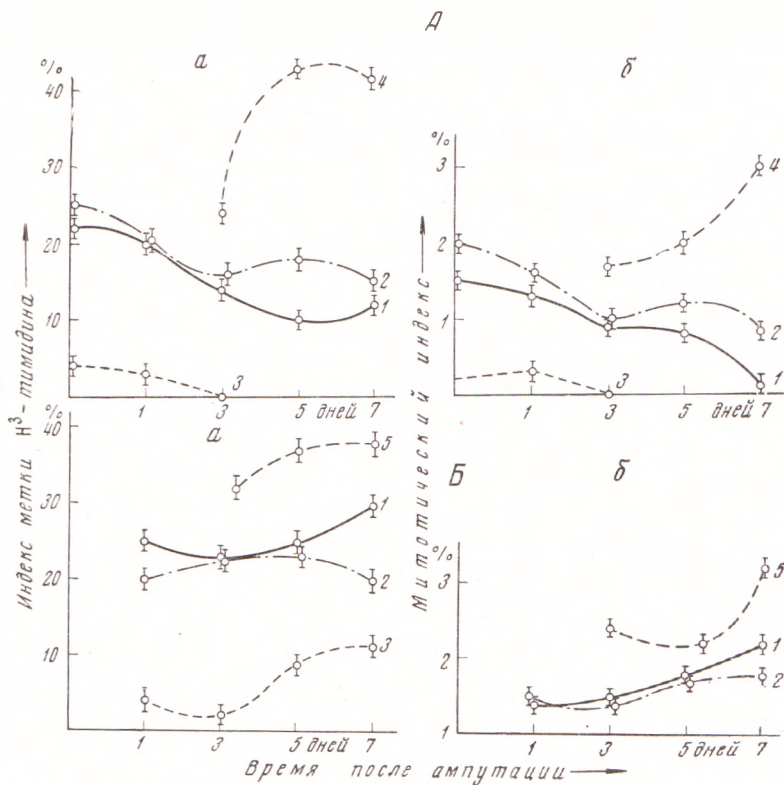


Рис. 1. Изменение ДНК-синтезирующей (а) и митотической (б) активностей тканей мезодермального происхождения конечностей головастиков, не регенерирующих после ампутации на стадии IIa (А) и регенерирующих при дополнительной травматизации (Б). 1 — мышечная ткань; 2 — хрящевой эпифиз; 3 — хрящевой диафиз; 4 — клетки в рубце; 5 — клетки бластемы

разрушаются и не дедифференцируются, упомянутые показатели постепенно снижаются, тогда как для клеток соединительнотканного рубца на раневой поверхности они очень высокие — такие же, как для клеток бластемы. После ампутации конечностей на стадии IIa и сильной дополнительной травматизации, когда конечности регенерируют, ткани мезодермального происхождения глубоко разрушаются и дедифференцируются, образуется бластема и уровень синтеза ДНК и митотический индекс в них и в бластеме повышаются по сравнению с таковыми в контрольных, ампутированных и нерегенерирующих конечностях. Поэтому, исходя из всего сказанного выше, можно сделать вывод, что утрата регенерационной способности конечностей у бесхвостых амфибий зависит от понижения спо-

способности тканей мезодермального происхождения к разрушению и дедифференцировке, а не от снижения уровня синтеза ДНК и митогической активности.

Институт биологии развития  
Академии наук СССР  
Москва

Поступило  
30 XI 1973

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

<sup>1</sup> Л. Я. Бляхер, Тр. лаб. эксп. биол. Московск. зоопарка, т. 4, 33 (1928). <sup>2</sup> Л. В. Полежаев, Арх. анат., гистол., эмбриол., т. 14, 384 (1935). <sup>3</sup> Л. В. Полежаев, Тр. Инст. цитол., гистол. и эмбриол., т. 2, в. 23 (1948). <sup>4</sup> С. Я. Тучкова, Л. В. Черкасова, Бюлл. МОИП, т. 9, 33 (1974). <sup>5</sup> Л. В. Черкасова, Матер. заседаний Московск. научн. общ. анат., гистол. и эмбриол., т. 2, 100 (1973). <sup>6</sup> Ide - Rozas, Roux' Arch. Entw. Mech., B. 135, 552 (1936).