

УДК 591.11

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОРФОЛОГИЯ

Л. В. ПОЛЕЖАЕВ

**ДЕДИФФЕРЕНЦИРОВКА ПРИ РЕГЕНЕРАЦИИ КОНЕЧНОСТЕЙ
У АМФИБИЙ И ИСТОЧНИКИ ОБРАЗОВАНИЯ
РЕГЕНЕРАЦИОННОЙ БЛАСТЕМЫ**

(Представлено академиком Н. П. Дубининым 25 VI 1975)

Одними из главных в учении о регенерации являются вопросы: каков механизм процесса регенерации, каковы источники образования регенерационного материала в зачатке или бластеме? Прежние представления (¹¹, ¹⁵) о том, что бластема образуется за счет индифферентных или резервных клеток, сменилось представлением о ее возникновении за счет дедифференцировки старых местных тканей остатка органа (³, ⁴, ⁷⁻¹⁰, ¹²⁻¹⁴). Показано, что основным источником образования клеток в бластеме являются местные ткани, непосредственно находящиеся в области ампутированной раневой поверхности остатка органа (⁴, ⁶, ⁷⁻⁹). Некоторые исследователи (², ⁵) возражают против вышеуказанного представления и утверждают, что понятие дедифференцировки неясно, неопределенно и что основным источником регенерации тканей органа являются индифферентные или камбиального типа клетки остатка органа. При этом либо отождествляют дедифференцировку с разрушением старых тканей (²), либо утверждают, что следует говорить не о дедифференцировке старых тканей, а об «активации» (²) или о «пластическом состоянии» тканей (⁵). Под дедифференцировкой понимают (³, ⁴), с одной стороны, упрощение организации клеток или тканей, исчезновение из них специфических компонентов, например, основного вещества из хряща, миофибрилл из мышечных волокон, а с другой, возникновение таких признаков, которые характерны для более молодых или эмбрионального типа клеток или тканей, например: наличием крупного светлого ядра, с крупным ядрышком, малой, в виде узкого ободка базофильной цитоплазмы, богатой рибосомами и бедной другими оргanelлами и почти или полностью лишенной специфических оргanelл, резким увеличением ядерно-плазменного отношения и др. При этом дедифференцированные клетки приобретают высокую способность к синтезу ДНК и пролиферации и обладают высокими формообразовательными потенциями. Однако тканевая специфичность дедифференцированных клеток может сохраняться, хотя в некоторых случаях они приобретают способность к метаморфозу, как например, клетки радужной оболочки глаза взрослого тритона, превращающейся в линзу (³, ⁴, ⁸, ⁹).

Цель настоящей статьи — выяснить происходит ли дедифференцировка тканей при регенерации конечностей у амфибий, являются ли местные ткани источником образования регенерационной бластемы и образуется ли бластема вследствие дедифференцировки старых тканей остатка органа?

Для решения этих вопросов мы поставили опыты на амфибиях, у которых метили Н³-тимидином ткани развивающихся конечностей и затем пересаживали эти меченые органы немеченым животным и прослеживали судьбу меченых тканей при трансплантации целых, неампутированных конечностей и отрезков конечностей, образовывавших после пересадки бластему и регенерировавших. Таким образом можно было выяснить, дедифференцируются ли ткани конечностей и участвуют ли они в образовании бластемы. Опыты были поставлены на головастиках травяной лягушки

Rana temporaria на стадии 1а и 1б по классификации (⁴), когда ткани после ампутации регенерируют в 100% случаев (³). В опыте было 100 реципиентов и 50 доноров, от которых брали задние конечности для пересадки. Под бинокулярной лупой у животных до основания ампутировали обе задние конечности, глазными ножницами с бедра срезали кожу и оголенную часть конечности пересаживали в кожный карман в область спины. До трансплантации конечностей животным-донорам внутрибрюшинно вводили ³Н-тимидин с удельной активностью 11 С/ммоль в дозе 2 мкС на 1 г веса, т. е. каждому головастику, весящему 0,5 г, вводили 1 мкС изотопа. Через 12—15 час. после инъекции у животных ампутировали цельные конечности или отрезки конечностей, состоящие из бедра и проксимальной половины голени, и пересаживали их в область спины немеченым животным, находящимся на стадии 1а, 1б. Первый день после операции животных не кормили, далее каждый день в качестве корма им давали растертые в ступке листья вареной крапивы. Воду меняли ежедневно. В каждом кристаллизаторе в объеме двух литров воды содержалось по 25—30 головастиков. Животных фиксировали в 10% формалине до операции и в разные сроки через 1, 3, 5, 7, 9, 10 и 11 дней после операции в количестве от 3 до 12 на каждый срок. Гистологическую обработку проводили обычным методом. Парафиновые срезы толщиной 6—7 мкм депарафинировали, покрывали эмульсией типа М и затем через 4 недели после экспозиции проявляли и окрашивали гематоксилин-эозином и пикрофуксином по Ван-Гизон.

Поставлены следующие серии опытов: интактные меченые конечности на стадии 1а, 1б — 6 животных; трансплантация целых меченых конечностей немеченым реципиентам — 32 животных; трансплантация отрезков меченых конечностей немеченым реципиентам — 51 животное.

На стадии 1а, 1б в бедре и голени находятся хрящевые диафизы *femur*, *tibia* и *fibula*, эпифизы еще не образовались и представлены прохондральными сгущениями клеток. Мышцы в бедре и голени представлены пакетами миобластов, мышечных трубочек или недифференцированных мышечных волокон. На стадии 1б диафизы скелетных элементов хрящевые, эпифизы уже формируются, пакеты мышц более развиты, чем на стадии 1а. На автографах видно, что в диафизах (рис. 1), а также в пакетах мышц бедра и голени и в мезенхимальных элементах имеется множество клеток с густой меткой (рис. 1 см вкл. к стр. 1189).

В опыте с пересадкой целых конечностей и их отрезков в первые 2—3 дня после операции трансплантаты сильно гиперемизируются, становятся ярко красными, набухают, далее гиперемия и отечность постепенно исчезают. Развитие или регенерация трансплантатов идет с разной скоростью. В некоторых случаях конечности регенерируют уже через 9—11 дней после пересадки, в других — в это время происходит только образование бластемы на стадии почки или конуса. Разная скорость регенерации зависит от разной стадии доноров и реципиентов (стадии 1а и стадии 1б) и разной степени разрушения и дедифференцировки тканей трансплантатов.

При пересадке целых конечностей в части случаев происходит побеление и некроз ступни и зачатков пальцев, в связи с недостаточностью кровоснабжения. В остальных случаях этих явлений не наблюдается, но происходит дедифференцировка трансплантатов: зубчики пальцев исчезают и дистальный конец конечности приобретает форму лопаточки.

Пересаженные целые конечности медленнее дифференцируются, чем собственные нормально развивающиеся задние конечности. При этом трансплантаты не только отстают по степени развития от нормальных конечностей, но и наблюдается дедифференцировка хрящевого скелета и мышц. Первыми разрушаются и дедифференцируются пакеты мышц, которые превращаются в скопления удлинённых клеток типа миобластов, которые диссоциируются, разделяются отечной жидкостью и форменными элементами крови. Хрящевые диафизы и эпифизы постепенно утрачивают

основное вещество, клетки сближаются друг с другом и образуют прохондральные сгущения, что было описано ранее (³, ⁶). При этом клетки дедифференцированных хряща и мышц в полной мере сохраняют свою жизне-способность и продолжают синтез ДНК: они содержат отчетливую метку.

На дистальной части конечности дедифференцировка выражена наиболее сильно. Здесь клетки образуют скопления мезенхимальных клеток, также содержащих густую метку. Позднее из этих дедифференцированных хрящей и мышц редифференцируются новые хрящи скелета и пакеты мышц, которые также содержат метку (рис. 2 см. вкл. к стр. 1189).

В опыте с пересадкой отрезков конечностей некроза тканей не происходит и сразу же начинается фаза разрушения и дедифференцировки и образование бластемы. Такие отрезки конечностей приживляются лучше, чем целые конечности. В этих случаях дифференцированные хрящевые скелетные части и пакеты мышц разрушаются и дедифференцируются, а затем редифференцируются. При дедифференцировке клетки хряща содержат ясно выраженную метку (рис. 2а). Метка находится и над дедифференцирующимися мышечными элементами (рис. 2б). Клетки, освободившиеся из дедифференцирующихся хряща и мышечных пакетов, превращаются в клетки бластемы и содержат метку (рис. 2в). В процессе дедифференцировки и образования бластемы метка постепенно разбавляется в связи с тем, что клетки интенсивно синтезируют ДНК и делятся путем митоза. Фигур митозов видно значительно меньше, чем клеток, содержащих метку, что соответствует известным данным о том, что они находятся в соотношении приблизительно 1 : 10 (⁸, ⁹).

Институт биологии развития
Академии наук СССР
Москва

Поступило
25 VI 1975

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Л. Я. Бляхер, Тр. Лаб. эксп. биол. Московск. зоопарка, т. 4, 125 (1928). ² Л. Д. Лиознер, Основные проблемы учения о регенерации, М., «Наука», 1975. ³ Л. В. Полежаев, Утрата и восстановление регенерационной способности органов и тканей у животных, М., «Наука», 1968. ⁴ Л. В. Полежаев, Арх. анат., гистол. и эмбриол., т. 66, № 2, 102 (1974). ⁵ А. Н. Студирский, В кн.: Дедифференцирование в процессе регенерации, М., Изд-во МГУ, 1973, стр. 72. ⁶ Т. М. Яковлева, Биол. журн., т. 7, 489 (1938). ⁷ E. G. Butler, Anat. Rec., v. 62, 295 (1935). ⁸ E. D. Hay, Regeneration, N. Y. — Chicago — San-Francisco — Toronto — London, 1966. ⁹ E. D. Hay, In: Results and Problems in Cell Differentiation, v. 1, The Stability of the Differentiated State, 1968, p. 85. ¹⁰ S. M. Rose, In: Physiology of the Amphibia, N. Y. — London, 1964, p. 545. ¹¹ J. Schaxel, Verh. Dtsch. zool. Ges., v. 24, Versamml., 1914. ¹² A. E. Schmidt, Cellular Biology of Vertebrate, Regeneration and Repair, Chicago — London, 1968. ¹³ Ch. S. Thornton, In: Advances in Morphogenesis, v. 7, 1968, p. 205. ¹⁴ H. A. L. Trampusch, A. E. Harrebomée, In: Regeneration in Animals and Related Problems, Amsterdam, 1965, p. 341. ¹⁵ P. Weiss, Entwicklungsphysiologie der Tiere, Dresden — Leipzig, 1930.



Рис. 1. Меченые ^3H -тимидином клетки тканей конечности головастика травяной лягушки на стадии Ia; клетки хряща Гематоксилин — эозин. Ок. $10\times$, об. $60\times$

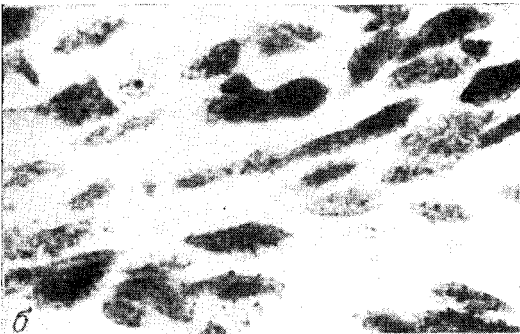
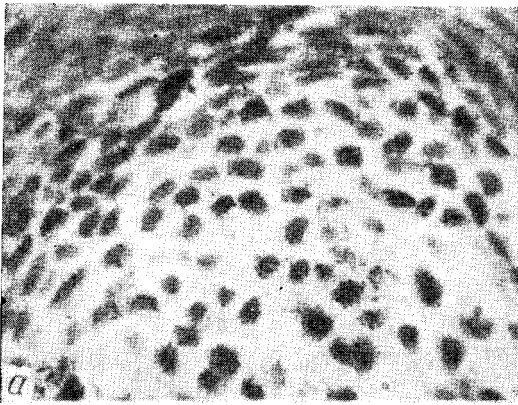


Рис. 2. Меченые ^3H -тимидином клетки тканей отрезков конечностей через 9 дней после гомотрансплантации. а — клетки хряща; б — мышечные клетки; а — клетки бластемы. Гематоксилин — эозин. Ок. $10\times$, об. $60\times$