

**Агильтон-Гутиеррес Д.Р.**

*Кандидат биологических наук*

*Дуранго государственный университет им. Хуареса*

**Aguillón-Gutiérrez D.R.**

*Ph.D. in Biological Sciences*

*Universidad Juárez del Estado de Durango*

## ИССЛЕДОВАНИЕ ПОВТОРНЫХ РЕГЕНЕРАЦИОННЫХ ПРОЦЕССОВ КОНЕЧНОСТИ ИСПАНСКОГО ТРИТОНА (*Pleurodeles waltl* – Michahelles 1830)

### STUDY OF REPEATED REGENERATION PROCESS IN THE LIMBS OF THE SPANISH NEWT (*Pleurodeles waltl* – Michahelles 1830)

**Аннотация:** В этой статье приведен результат анализа регенерации задней конечности у испанского тритона (*Pleurodeles waltl*) при наблюдении длины и площади регенерата а так же нарушения скелета стопы. Было показано что 4-я регенерация происходит медленнее, чем после первой. Анализ вариантов нарушений формирования скелетных элементов показал, что при последовательных регенерациях наблюдается нарастание степени гипоморфности регенерата и что встречаемость аномалий скелетных элементов позволяет предположить относительную независимость регуляции морфогенеза этих элементов.

**Ключевые слова:** регенерация, конечности, нарушение скелетных элементов, *Pleurodeles waltl*.

**Abstract:** This article shows the result of analysis of the regeneration of the hind limb of the Spanish newt (*Pleurodeles waltl*) by observing the length and the area of the regenerated part as well as disorders of the skeleton of the foot. It has been shown that the 4th regeneration takes place more slowly than the first. Analysis of variants of disorders in the formation of skeletal elements revealed that in successive regenerations the degree of hypomorphic regenerate increases, and that the incidence of skeletal abnormalities of elements suggesting the relative independence of the regulation of morphogenesis of these elements

**Keywords:** Regeneration, limbs, anomalies of the skeletal elements, *Pleurodeles waltl*.

#### ВВЕДЕНИЕ

Регенерацию можно отнести к обширной группе явлений регуляции. Сюда относятся все процессы биологии, смысл которых состоит в приведении организма в состояние физиологической нормы (или в приближении к этому состоянию) после того, как какие-нибудь причины выведут его из этого состояния. Не смотря на то, что явление регенерации давно известно, оно и по сей день остается одним из наиболее интересных и широко изучаемых направлений в биологии. Для биологии развития регенерация представляет большой интерес, т.к. она является процессом индивидуального развития части организма, хотя и повторным. В регенерирующей структуре вновь начинают работать многие из тех генетических и эпигенетических программ, которые функционируют в эмбриогенезе этой структуры.

Регенерация — это важная и современная биомедицинская проблема. При исследовании регенерационных процессов на разных уровнях необходимо привлечение и других биологических дисциплин, например, анатомии, гистологии, эмбриологии, клеточной и молекулярной биологии, биохимии и генетики. Среди позвоночных она наиболее выражена у хвостатых амфибий, способных во взрослом состоянии восстанавливать утраченные конечности, хвост, челюсти, хрусталик глаза (Вольфовская регенерация).

Полнота восстановления утраченных органов зависит от многих причин. Общепринятое мнение, что повторные регенерации идут со все большими отклонениями от нормы.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования были особи ребристого (испанского) тритона *Pleurodeles waltl* (Michahelles, 1830). Работа явилась частью длительного эксперимента по исследованию регенерации при многократных ампутациях — у животных этой группы уже были проведены 4 ампутации задних конечностей с интервалом в 4 месяца. Ампутация проксимодистальной оси приводит к образованию пролиферативной зоны (бластема), потом всех дистальные структуры будут регенерировать. [9, с. 391].

Способ проведения ампутации: тритонов наркотизировали в 0,3%-м растворе MS-222 (метилсульфоната этилового эфира метааминобензойной кислоты), помещали на поверхность стеклянной чашки Петри и скальпелем отрезали обе задние конечности на уровне проксимальной трети бедра. Плоскость ампутации проходила перпендикулярно проксимо-дистальной оси конечности. Ампутированные конечности фиксировали 10% раствором формалина.

После операции животных содержали отдельно друг от друга в пластиковых контейнерах, наполняемых равным объемом воды (1 литр), кормили мясом два раза в неделю. Наследующий день после кормления проводили смену воды. Сохраняли нумерацию тритонов в эксперименте, чтобы проследить индивидуальные особенности процессов последовательных регенераций. Отмечали температуру воды. Мы использовали группу из 31 испанского тритона.

В течение 6 первых недель регенерации 1 раз в неделю проводили прижизненную съемку регенерирующей конечности с помощью МБС-10, оборудованного видеокамерой Campro video professional, подключенной к компьютеру (программное обеспечение на компьютере — iuVCR49.2.35.5.). При съемке соблюдали проксимо-дистальную и антерио-постериорную параллельность регенерата столику бинокля. Изображения подвергали морфометрической обработке в программе Plana, разработанной в Институте биофизики РАН (г. Пущино), измеряя длину и площадь дорзо-вентральной проекции регенерата.

Зафиксированные ампутированные конечности и, дополнительно, ампутанты, полученные при предыдущей (2-й) операции препарировали с дорзальной поверхности так, чтобы обнажался скелет регенерата. Скелет контрастировали окрашиванием препарата конечностей метиленовым синим. Сопоставляли особенности строения дистальных отделов конечности с типичной для задней конечности испанского тритона.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Динамику четвертой регенерации задней конечности испанского тритона мы регистрировали с недель-

ным интервалом в течение первых 7 недель (рис.1 — регенерация левой конечности тритона). Рост бластемы отмечен, начиная с 42 дня после ампутации, и лишь на 49 день регенерат малого размера достигает стадии «лопатки» — уплощение дистальной части бластемы в дорзо-вентральном направлении.

Хотя поздние этапы в регенерации конечности соответствуют развитию конечности ранние этапы, на которых формируется бластема, характерны только для регенерации [10, с. 140].

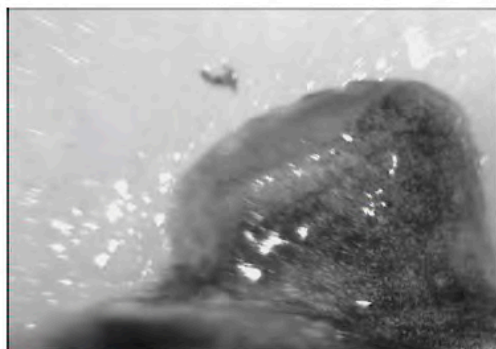
У этого же животного после 1-й ампутации развития регенерата той же конечности происходило значительно быстрее — уже на 35 день после ампутации регенерат представлял собой конечность с ранним развитием пальцев (рис. 2). После 5 недели появляются пальцы и происходит мобилизация конечности (конечность начинает функционировать) [8, с. 325]. У хвостатых амфибий в задней конечности чаще сохраняются все пальцы, 1-я и 2-я тарзальные дистальные кости слиты воедино [2, с. 138]. Фаланговая формула показывает число фаланг в каждом пальце, начиная с внутреннего и кончая наружным. У амфибий число фаланг обычно невелико по две или три на палец. Число фаланг (и длина пальцев) равномерно увеличивается от первого пальца к четвертому; пятый палец редуцирован в размерах и числе фаланг и, как правило, отклоняется вентрально от остальных четырех, возможно, потому, что при расставленном положении конечностей у примитивных тетрапод кисть, хотя и повернута несколько вперед, ставится на землю под углом [6, с. 256].

Кроме того, по сравнению с первой регенерацией, в результате которой развилась почти нормальная пятипалая конечность (наблюдалось только нерасхождение 2-го и 3-го пальцев), после четвертой ампутации на том же месте регенерирует гипоморфная ластоподобная конечность.

Мы провели морфометрический анализ регенератов, развивающихся после первой (по изображениям, сделанным ранее на этих же животных) и четвертой ампутации, и выявили достоверные отставания темпов роста регенератов после 4-й ампутации и по длине (рис. 3), и по площади дорзовентральных проекций (рис. 4), начиная с 35 дня развития.

Во второй части нашей работы мы отпрепарировали и проанализировали строение 52 конечностей 26 тритонов после завершения второй регенерации, и 44 регенерата от 24 тритонов (4 регенерата были утрачены при хранении материала) после завершения третьей регенерации.

Скелеты регенератов задних конечностей в разной степени отличались от описанной ранее нормы (рис. 5). У *Urodela* вообще фаланговая формула (число фаланг, считая с первого пальца) — 2-2-3-3-2 [5, с. 35]. У хвостатых земноводных они сохраняются



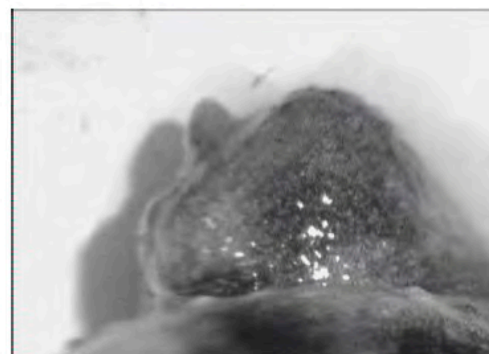
14 дней



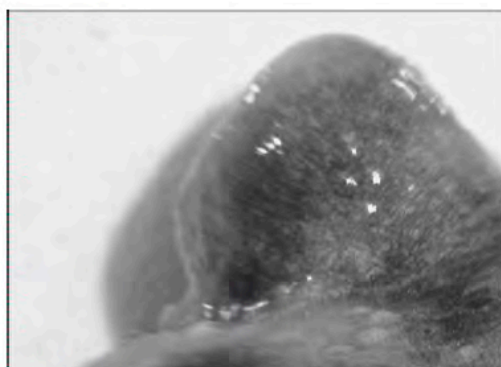
42 дня



21 день



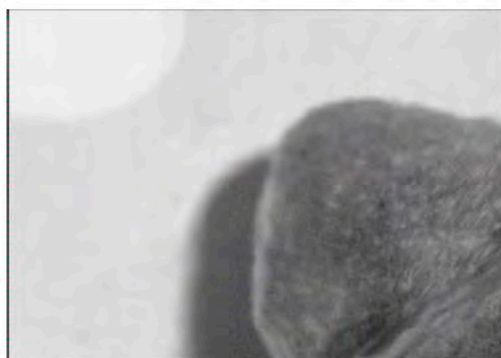
49 дней



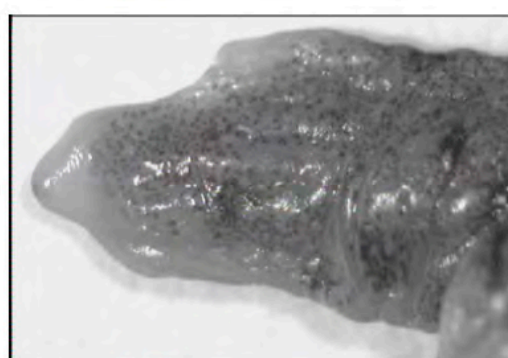
28 дней



91 день

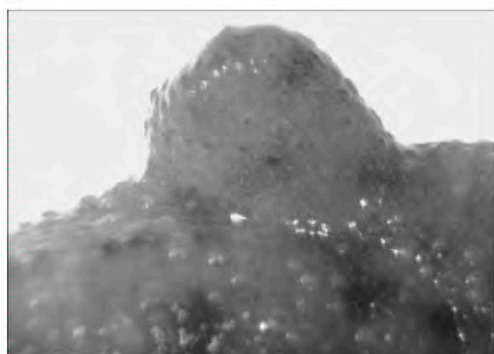


35 дней



153 дня

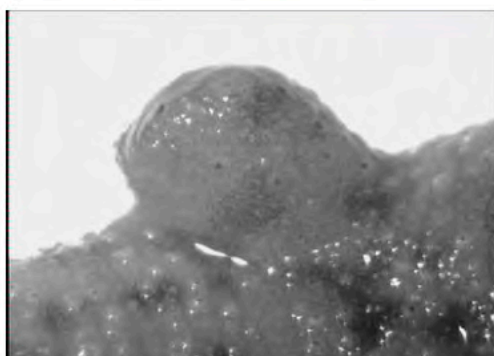
Рис. 1. Развитие регенерата задней конечности испанского тритона (*Pleurodeles waltl*) после 4-й ампутации



14 дней после ампутации



42 дня



21 день



49 дней



28 дней



91 день



35 дней

Рис. 2. Развитие регенерата задней конечности испанского тритона (*Pleurodeles waltl*) после 1-й ампутации



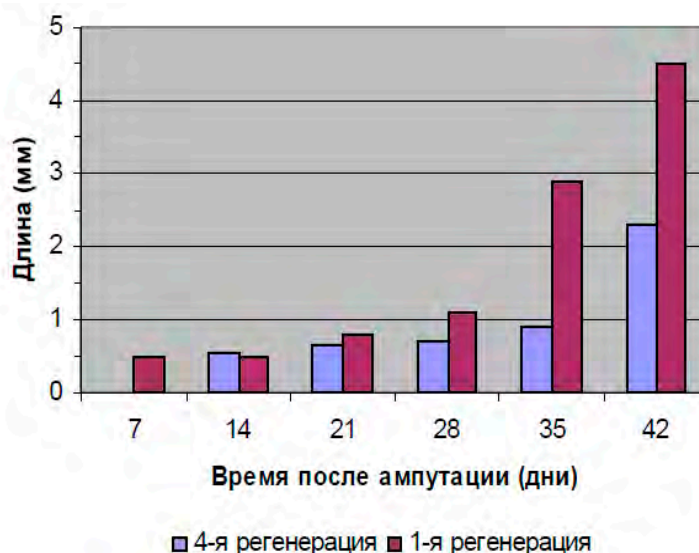


Рис. 3. Изменение длины регенератов задней конечности испанского тритона (*Pleurodeles waltl*) после 1-й и 4-й ампутации

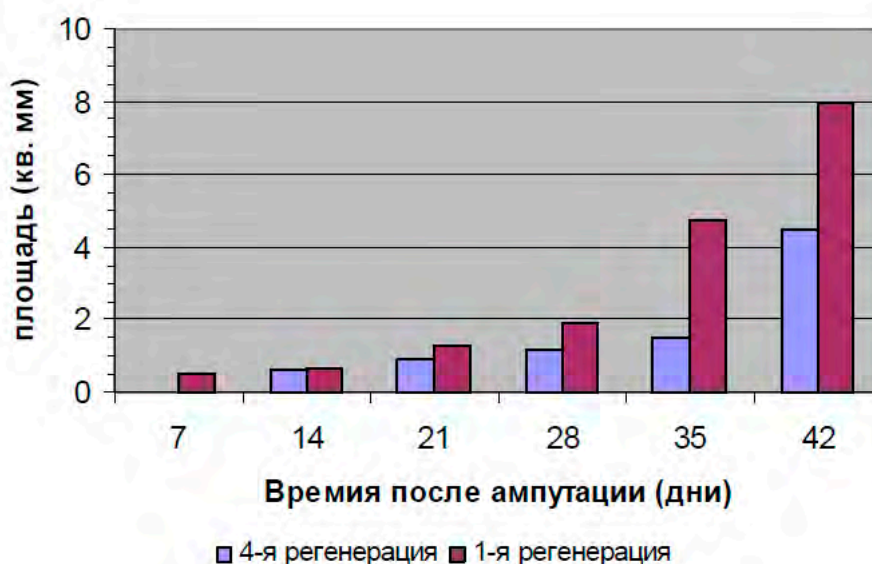


Рис. 4. Изменение площади dorзо-вентральных проекций регенератов задней конечности испанского тритона (*Pleurodeles waltl*) после 1-й и 4-й ампутации

разделенными. Проксимальный отдел предплюсны – tarsus – в норме имеет 9 костей. Плюсна (metatarsus) образована пятью длинными косточками, к которым причленяются фаланги пальцев (phalanges digitorum) [3, с. 50]. Передние и задние конечности более чем 70% индивидуумов имеют стандартное строение [12, с. 880].

Чаще всего при регенерации число скелетных элементов обычно уменьшается из-за объединения, вернее, необособления костей. Мы выделяли среди встречающихся нарушений следующие варианты (рис. 5):

- 1 – centrale distale + tibiale;
- 2 – intermedium + centralia;

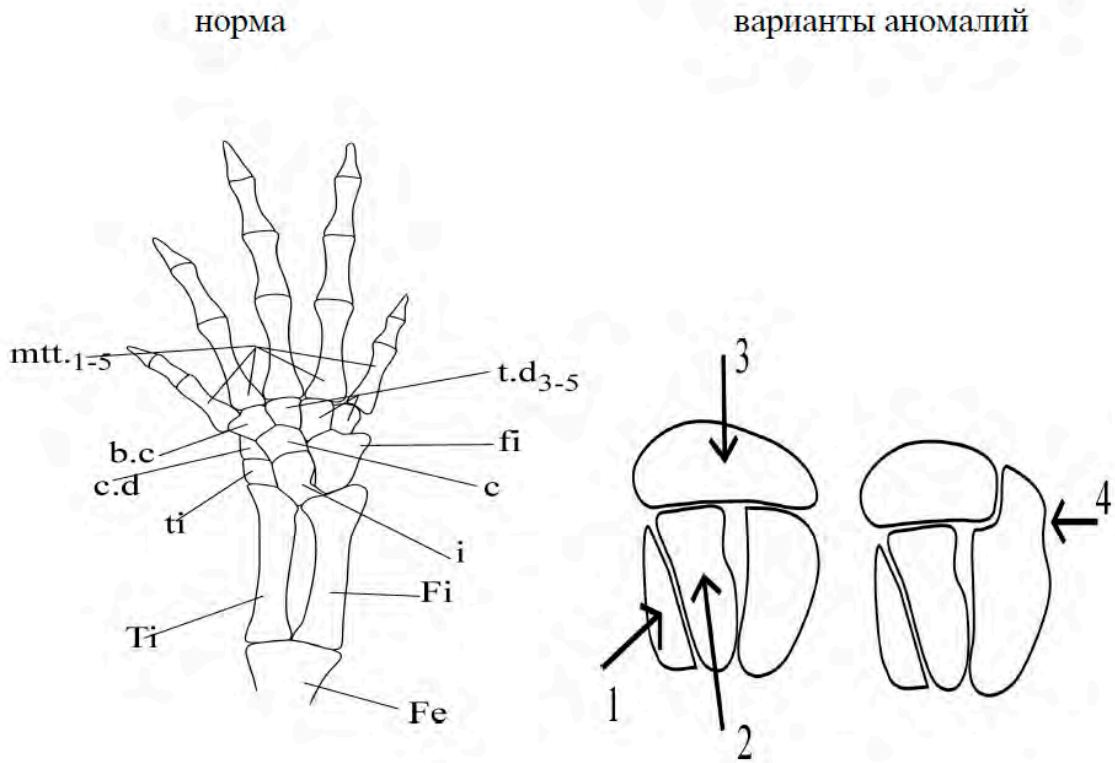
- 3 – уменьшение числа элементов дистального ряда;
- 4 – fibulare + tarsale distale;
- 5 – уменьшение числа метатарсальных элементов;
- 6 – нарушение в фаланговой формуле.

Встречаемость разных вариантов нарушений в строении стопы регенератов конечности при последовательных регенерациях (%) (рис. 6).

В анализ аномалии скелета 24 задних конечностей тритонов в последовательных регенерациях получилось следующий:

1-я регенерация:

Нарушения Centrale distale+tibiale 10 конечности



b.c – basale commune; c – centrale; c.d – centrale distale; Fe – бедренная кость (femur); Fi – малая берцовая кость (fibula); fi – fibulare; i –intermedium; mtt1-5 – элементы плюсны (metatarsalia); Ti – большая берцовая кость (tibia); ti – tibiale; 1-5 номера пальцев.

1 –centrale distale+tibiale;  
 2 –intermedium+ centrale;  
 3 – уменьшение числа элементов дистального ряда  
 4 – fibulare+tarsale distale;

Рис. 5. Схема нормальной задней конечности испанского тритона (*Pleurodeles waltl*) и типичных аномалий скелета стопы [4, с. 60].

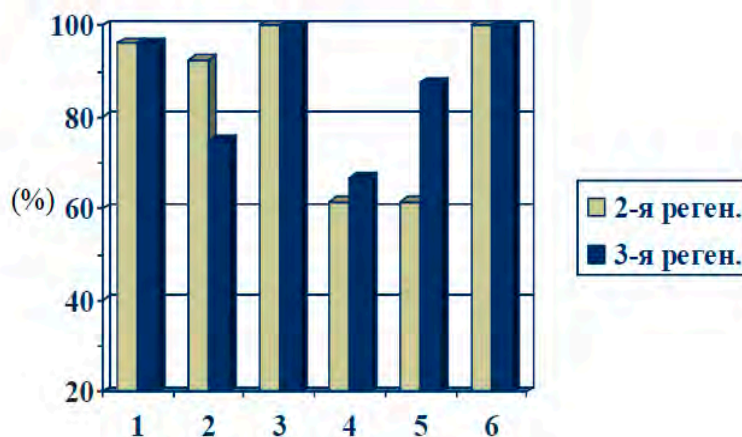


Рис. 6. Анализ нарушений между второй и третьей регенерации.  
 1 – centrale distale+tibiale; 2 – intermedium+centrale;  
 3 – уменьшение числа элементов дистального ряда; 4 – fibulare+tarsale distale;  
 5 – уменьшение числа метатарзальных элементов; 6 – нарушение в фаланговой формуле

Нарушения Intermedium+centrale 4 конечности  
Нарушения уменьшение числа метатарзальных элементов 8 конечности  
Нарушения Fibulare+tarsale distale 2 конечности  
Нарушения дополнительный элемент 3 конечности

2-я регенерация:

Нарушения Centrale distale+tibiale 21 конечности  
Нарушения Intermedium+centrale 22 конечности  
Нарушения уменьшение числа метатарзальных элементов 24 конечности  
Нарушения Fibulare+tarsale distale 15 конечности  
Нарушения дополнительный элемент 0 конечности

3-я регенерация:

Нарушения Centrale distale+tibiale 22 конечности  
Нарушения Intermedium+centrale 16 конечности  
Нарушения уменьшение числа метатарзальных элементов 24 конечности  
Нарушения Fibulare+tarsale distale 9 конечности  
Нарушения дополнительный элемент 0 конечности

Известно, что при регенерации конечностей наряду с эуморфными развиваются гипо- и гиперморфные формы стопы, и этот эффект усиливается при регенерации после повторной ампутации [7, с. 45].

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, эксперимент, длящийся уже 1,5 года, одним из этапов которого была наша работа, позволил проследить динамику и результат последовательных регенераций задней конечности испанского тритона в течение длительного периода его жизни. Первая и вторая охватывали ювенильный период, третья в период полового созревания, который у испанского тритона происходит между 11 и 12 месяцами [1, с. 350] и четвертая идет у половозрелых животных. Поэтому интересно будет сопоставить регенера-

ционные способности в связи не только с возрастом, но и, прежде всего, с разным гормональным фоном организма при протекании регенерационных процессов. Возможно, это связано с таким значительным торможением регенерационных процессов, наблюдаемых нами после 4-й ампутации. Трудно предположить, почему вторая регенерация, прошедшая в марте-июне прошлого года, привела к формированию наиболее аномальных регенератов, тогда как в результате последующей, 3-й (июль-октябрь) число аномалий снизилось. Температурные колебания не превышали 4° (+19 – +22), изменений в режиме кормления также не было. Поэтому данный результат явился совершенно неожиданным. Регенерационная способность меняется с возрастом — например, у личинок *Ambistoma maculatum* новые конечности регенерируют через 21 день после ампутации при комнатной температуре 21–23° С. [11, с. 285].

### ВЫВОДЫ

1. Четвертая регенерация задней конечности испанского тритона происходит значительно медленнее, чем после первой ампутации, и по темпам роста, и по темпам развития регенерата. Достоверные различия в скорости процессов наблюдаются к 35 суткам после ампутации.

2. Анализ вариантов нарушений формирования скелетных элементов стопы показал, что при последовательных регенерациях наблюдается нарастание степени гипоморфности регенерата. Гиперморфные регенераты встречались только после первой ампутации.

3. Встречаемость аномалий формирования скелетных элементов разных участков стопы в ряду последовательных регенераций позволяет предположить относительную независимость регуляции морфогенеза этих элементов, что выражается в усилении дестабилизации постаксиальных элементов и, наоборот, стабилизации морфогенеза элементов второго преаксиального луча.

### Литература

1. Васецкий С.Г. 1975. Испанский тритон *Pleurodeles waltlii* Michah. В кн.: Объекты биологии развития. М., Наука, 342–369 с.
2. Дзержинский Ф.Я. 2005. Сравнительная анатомия позвоночных животных. МГУ. 135–139 с.
3. Карташев Н. Н., 2004. Соколов В. Е., Шилов И. А. Практикум по зоологии позвоночных. МГУ. 113 с.
4. Никифорова А.И. 2007. Особенности регенерации конечности испанского тритона *Pleurodeles waltlii* (Michah). Курсовая работа, биологический факультет, МГУ.
5. Риваненкова М.Л., Соколов А.Ю., Ахматова Е.Н., Бурлакова О.В., Голиченков В. А. 2006. Атипичность регенератов конечности *Urodela*: отклонение или закономерность // Вестн. Моск. Ун-та. Сер. 16 биология. No. 3. P. 29–39.

6. Ромер А., Парсонс Т., 1992. Анатомия позвоночных 1. Мир. 256–257 с.

7. Хефни Х.А. 1991. Развитие Конечностей амфибии в норме и при экспериментальных воздействиях. Кандидатская диссертация, Биологический факультет, МГУ. 79 с.

8. Ebert J. D., Sussex I. M. 1977. Sistemas que interactuan en el desarrollo. CECSA. 325–326 с.

9. Echeverri K., Tanaka E. M. 2005. Proximodistal patterning during limb regeneration. // *Dev. Biol.* V. 279. P. 391–401.

10. Endo N., Bryant S.V., Gardiner D. M. 2004. A stepwise model for limb regeneration. // *Dev. Biol.* V. 270. P. 134–145.

11. Nye H. L., Cameron J. A., Chernoff E. A., Stocum D. L. 2003. Regeneration of the Urodele limb: A review. // *Dev. Dyn.* V. 226. P. 280–294.

12. Shubin N., Wake D. B., Crawford A. J. 1995. Morphological variation in the limbs of *Tarchica granulosa* (Caudata: Salamandridae): evolutionary and phylogenetic implication. // *Evolution.* V. 49(5). P. 874–884.

#### References

1. Vaseczky'j S. G. 1975. Y'spansky'j try'ton *Pleurodeles waltlii* Michah. V kn.: *Объекты by'ology'y' razvy'ty'ya.* M., Nauka., 342–369 s.

2. Dzerzhy'nsky'j F. Ya. 2005. Sravny'tel'naya anatomy'ya pozvonochny'kh zhy'votny'kh. MGU. 135–139 s.

3. Kartashev N.N., 2004. Sokolov V. E., Shy'lov Y'. A. *Prakty'kum po zoology'y' pozvonochny'kh.* MGU. 113 s.

4. Ny'ky'forova A. Y'. 2007. Osobennosty' regeneracy'y' konechnosty' y'spanskogo try'tona *Pleurodeles waltlii* (Michah). *Kursovaya rabota, by'ology'chesky'j fakul'tet, MGU.*

5. Ry'vanenkova M. L., Sokolov A. Yu., Axmatova E.N., Burlakova O. V., Goly'chenkov V. A. 2006. Aty'ptchnost' regeneratov konechnosty' Urodela: otkloneny'e y'ly' zakonomernost' // *Vestn. Mosk. Un-ta. Ser. 16 by'ology'ya.* No. 3. P. 29–39.

6. Romer A., Parsons T., 1992. Anatomy'ya pozvonochny'kh 1. My'r. 256–257 s.

7. Xefny' X. A. 1991. Razvy'ty'e Konechnostej amfy'by'y' v norme y' pry' ekspery'mental'ny'kh vozdejstvy'yah. *Kandy'datskaya dy'ssertacy'ya, By'ology'chesky'j fakul'tet, MGU.* 79 s.

8. Ebert J. D., Sussex I. M. 1977. Sistemas que interactuan en el desarrollo. CECSA. 325–326 с.

9. Echeverri K., Tanaka E. M. 2005. Proximodistal patterning during limb regeneration. // *Dev. Biol.* V. 279. P. 391–401.

10. Endo N., Bryant S.V., Gardiner D. M. 2004. A stepwise model for limb regeneration. // *Dev. Biol.* V. 270. P. 134–145.

11. Nye H. L., Cameron J. A., Chernoff E. A., Stocum D. L. 2003. Regeneration of the Urodele limb: A review. // *Dev. Dyn.* V. 226. P. 280–294.

12. Shubin N., Wake D. B., Crawford A. J. 1995. Morphological variation in the limbs of *Tarchica granulosa* (Caudata: Salamandridae): evolutionary and phylogenetic implication. // *Evolution.* V. 49(5). P. 874–884.