

РЕГЕНЕРАЦИЯ ПИГМЕНТНОЙ СИСТЕМЫ КОЖИ В ЛИЧИНОЧНОМ РАЗВИТИИ ШПОРЦЕВОЙ ЛЯГУШКИ

© 2017 г. А. Ю. Молчанов*, О. В. Бурлакова, В. А. Голиченков

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет
119234, Россия, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12

*E-mail: alexandermsu@gmail.com

Поступила в редакцию 29.08.2016 г.

Показана возможность восстановления пигментной системы покровов личинок шпорцевой лягушки после локального повреждения меланофоров без разрушения кожного покрова. Сопоставлен вклад в восстановление пигментации поврежденного участка за счет дифференцировок меланофоров *de novo* и митотических делений неповрежденных меланофоров, локализованных по границе участка. Прослежен процесс регенерации в разные периоды развития пигментной системы личинок. Установлено более интенсивное развитие пигментации у животных при восстановлении по сравнению с онтогенетической динамикой.

Ключевые слова: регенерация, меланофор, пигментная система

DOI: 10.7868/S0475145017010098

ВВЕДЕНИЕ

Пигментная система амфибий, особенно в личиночный период их развития, является уникальным объектом, моделирующим многоуровневые процессы, обеспечивающие онтогенез:

– пролиферация клетки, в т.ч. и дифференцированной;

– дифференцировка с непосредственной визуализацией интенсивности процесса по появлению продуктов специфического синтеза – меланинов;

– разноуровневые механизмы, обеспечивающие целостность системы и их иерархия;

– процесс старения и гибели, поскольку “жизнь” личиночных меланофоров заканчивается в период метаморфоза, когда они сменяются новой волной дифференцировки резервных клеток в меланофоры, существующих в составе структурно-функциональных хроматофорных единиц постметаморфозной кожи с другими типами пигментных клеток;

– становление временной организации онтогенеза, поскольку основной водитель ритмов в организме – мелатонин, – является основным гормоном, определяющим агрегацию пигментных гранул в меланофоре в перикариальное положение при физиологических пигментных реакциях.

Меланофоры послужили и одним из самых благодатных объектов для исследования направленного внутриклеточного транспорта.

Особенно привлекательным делает эту модель возможность направленно влиять на те или иные процессы, дозируя функциональные нагрузки.

Исследование регенерационных способностей пигментной системы – еще один аспект изучения регуляторных механизмов, обеспечивающих поддержание и возврат организма к физиологической норме.

Способность амфибий к эпиморфному восстановлению наивысшая среди позвоночных, тогда как у высших позвоночных и человека репаративная регенерация ограничивается, скорее, тканевыми восстановлениями без анатомического морфогенеза. Вероятно, это определяется глубиной дедифференцировки элементов, создающих цитологическую основу восстановления утраченного элемента – у низших это клетки бластемы, имеющие широкие дифференцировочные и морфогенетические потенции, а у высших это стволовые клетки, потентность которых, ограничена морфогенезом, в лучшем случае, микроанатомических элементов (функциональных единиц) поврежденных структур. Первые подходы к подобному взгляду на регенерацию возможно разработать на модели регенерационной способности пигментной системы в личиночный период развития бесхвостых амфибий, поскольку эта модель может удачно сочетать элементы репаративной и физиологической регенерации.

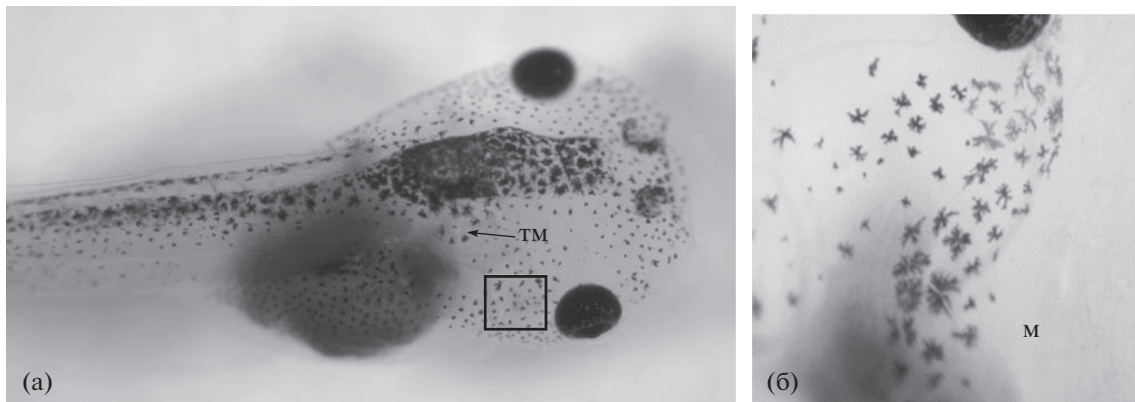


Рис. 1. а – Расположение выбранного для проведения операции по разрушению дермальных меланофоров участка покровов личинки шпорцевой лягушки (выделен рамкой): т – тимус; б – выявление митотически поделившихся меланофоров по характерному расположению дочерних клеток (Стародубов, Голиченков, 1978, 1979): тм – меланофоры, прошедшие митотическое деление.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В эксперименте использовали личинок шпорцевой лягушки *Xenopus laevis* (Daudin.) 46, 48, 52 и 54 стадий развития по таблицам Ньюкупа и Фабера (Nieuwkoop, Faber, 1956). Меланофоры, расположенные в дермальном слое кожи, разрушали с помощью механического давления стеклянным микрозондом на кожу личинки (без нарушения целостности покровов) в определенной области каудальнее левого глаза и латеральнее области тимуса личинки (рис. 1а), ориентируясь на расположение кровеносных сосудов. Такой тип разрушения ткани без повреждений покровов был в свое время предложен Г.П. Коротковой (Короткова, Агафонова, 1976) для исследования регенерационных способностей кишки у круглых червей. Операцию проводили при холодовой анестезии (с добавлением в операционное поле льда), под бинокулярной лупой МСП-1. Перед операцией животных выдерживали на свету на черном фоне, чтобы пигмент в меланофорах был максимально диспергирован по клетке. Контролем репарации повреждения меланофорной популяции служил симметричный оперированному участок личинки (К), дополнительным контролем (К_н) – аналогичный оперированному участок покровов интактной личинки той же стадии из той же кладки, что и оперированная личинка. В опытной и контрольной группах было по 3–5 личинок, опыты проведены в 5–7-ми кратной повторности. Животных содержали в термостате при 23°C и постоянной освещенности 40–50 lx на сером фоне, что поддерживает постоянный уровень меланоцитарных гормонов в организме личинки, определяя промежуточную степень дисперсии пигмента в меланофорах покровов (Джапова и др., 2012; Молчанов и др., 2013). Регистрацию репаративных процессов вели по ежедневной прижизненной фотосъемке (цифровая камера Tour Sam 5.1) под

бинокулярном МСП-1 оперированного и симметричного контрольного участка личинки и интактного контроля. Анализ динамики восстановления пигментации проводили по методике, разработанной в лаборатории (Вассиф и др., 1989), сопоставляя взаимное расположение индивидуальных меланофоров на микрофотографиях и определяя появление новых меланофоров либо в результате митотической активности дермальных меланофоров (рис. 1б), либо за счет дифференцировки *de novo*. Темпы изменения пигментации оценивали в процентном отношении к числу первоначально присутствующих на анализируемых участках меланофоров. При оценке темпов репарации пигментной системы с учетом нормального развития за срок наблюдения сравнивали относительное число меланофоров на оперированном участке к контрольным показателям по окончании восстановительного процесса (100%).

Дополнительно проводили гистологический контроль репарации пигментной системы на серии фронтальных срезов личинок, проходящих через оперированную область. Личинок фиксировали после очередной фотосъемки. Использовали фиксатор Бродского (формалин, спирт, уксусная кислота 9 : 6 : 1). Окраска – гематоксилин-эозин. Толщина срезов – 6–7 мкм. Препараты фотографировали с помощью цифровой камеры (Tour Sam 5.1) под микроскопом Микромед.

Для статистической обработки данных использовали стандартные методы оценки результатов с использованием пакета статистических программ Statistica.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

После многократного скользящего движения кончика микрозонда по покровам животного большая часть меланофоров разрушалась – в опе-

рационном поле можно увидеть в дерме свободно лежащие меланосомы (рис. 2б, 3б). Очищение поврежденного участка продолжается несколько суток, даже на 5-й день после операции на гистологических препаратах выявляли макрофаги, заполненные меланином, осуществлявшие эвакуацию дегрида (рис. 3в). В оперированной зоне до 10–15% меланофоров не разрушается, по крайней мере через сутки после операции демонстрируя сохранение способности к физиологическим реакциям (перераспределению меланосом по клетке). На 3 день после операции среди них выявляются первые митотически поделившиеся клетки — хорошо различимы характерно расположенные дочерние клетки (рис. 2г, ми). Тогда же становятся заметны вновь появившиеся пигментированные клетки (рис. 2г, нм). На 5 день число новодифференцированных меланофоров значительно увеличивается, но их размеры остаются значительно меньшими, чем размеры пигментных клеток, сохранившихся после операции на поврежденном участке или лежащих рядом с операционным полем (рис. 2д). В течение последующих дней число меланофоров продолжает увеличиваться, но после 7 дня темпы прироста снижаются. К 12-му дню число пролиферирующих и вновь дифференцированных меланофоров в опытной группе на исследуемом участке покровов уже недостоверно отличается от интактного контроля и от контрольных симметричных участков оперированных животных. Т.е. считаем, что к этому времени процесс репарации пигментации покровов заканчивается. Следует отметить, что темпы увеличения пигментных клеток в группах К (симметричных участках оперированных животных) и $K_{ин}$ (соответственно, интактного контроля) на протяжении периода наблюдений не различались достоверно как по общему числу новых меланофоров, так и по темпам дифференцировки и митозов зрелых меланофоров — т.е. само повреждающее действие на отражалось на пигментной системе в целом. Итоговое число меланофоров в области поражения всегда превышает показатель контрольных групп. Так, на 12 день эксперимента у оперированных на 48 стадии личинок число меланофоров в зоне наблюдения увеличилось на в среднем на 22% от числа клеток до локального повреждения, в то время как на аналогичном участке кожи у контрольных групп всего на 4%. Подобное повышение интенсивности пигментации в посттравматической регенерации отмечено и при восстановлении меланофоров в регенерирующих покровах каракатицы (Yacob et al., 2011).

В наших экспериментах встречались единичные случаи, когда меланофор полностью был разрушен (рис. 2в, 2г, чпм), но на 5 день клетка восстанавливалась и демонстрировала способность к перераспределению меланосом, согласно световым условиям (рис. 2д, 2е, вм). Т.о. пигмент-

ная система может восстанавливаться не только за счет появления новых клеток, но и за счет регенерационных способностей составляющих ее меланофоров при условии неполного разрушения, соединяя репарационные процессы разных уровней.

Появившиеся *de novo* меланофоры значительно мельче, чем интактные клетки или образованные в результате митотического деления зрелых меланофоров (рис. 2). В процессе развития и роста личинки различие в размерах между интактной и новообразованной пигментными клетками становится все более очевидным (Молчанов и др., 2014). Возможно поэтому для заполнения искусственно депигментированного участка в соответствующих пропорциях организма требуется все большее число пигментных клеток, а отношение числа клеток по окончании процесса репарации к их числу до операции увеличивается на каждой последующей стадии развития.

Особенности динамики восстановительных процессов у личинок разных стадий развития мы попытались соотнести с динамикой нормального развития пигментной системы шпорцевой лягушки в личиночный период, где четко выделяется 5 периодов (Джапова и др. 2012):

I период — период первоначальной дифференцировки личиночных меланофоров от момента вылупления до 46 стадии (во время этого периода продолжительностью 3–5 сут возникает основное количество меланофоров, причем только в результате дифференцировки из меланобластов);

II период — увеличение размеров меланофоров, возникших ранее, при незначительном изменении численности за счет отдельных митозов и дифференцировок меланобластов (стадии 47–51);

III период — резкое увеличение численности меланофоров, которое происходит как за счет митозов, так и за счет дифференцировок (стадии 52–56);

IV период — появление новой генерации дермальных меланофоров (с 58 стадии, предшествующей метаморфозному климаксу), участвующих в образовании хроматофорной единицы постметаморфозных животных;

V период — деградация личиночных меланофоров (стадия 61–62).

Мы проследили характер восстановления пигментации после разрушения меланофоров участка покровов личинок на стадиях развития, соответствующих определенным периодам онтогенетического становления пигментной системы. Стадии до 46 не были взяты в эксперимент, т.к. в связи с высокими темпами увеличения пигментации в контроле, сложно было бы оценить темпы репарации. Группы личинок, прооперированных на 46 и 48 стадиях, восстанавливали пигментацию покровов, находясь на начальной и, соответственно, на конечной фазе II-го периода развития пигментной системы, характеризующегося в норме

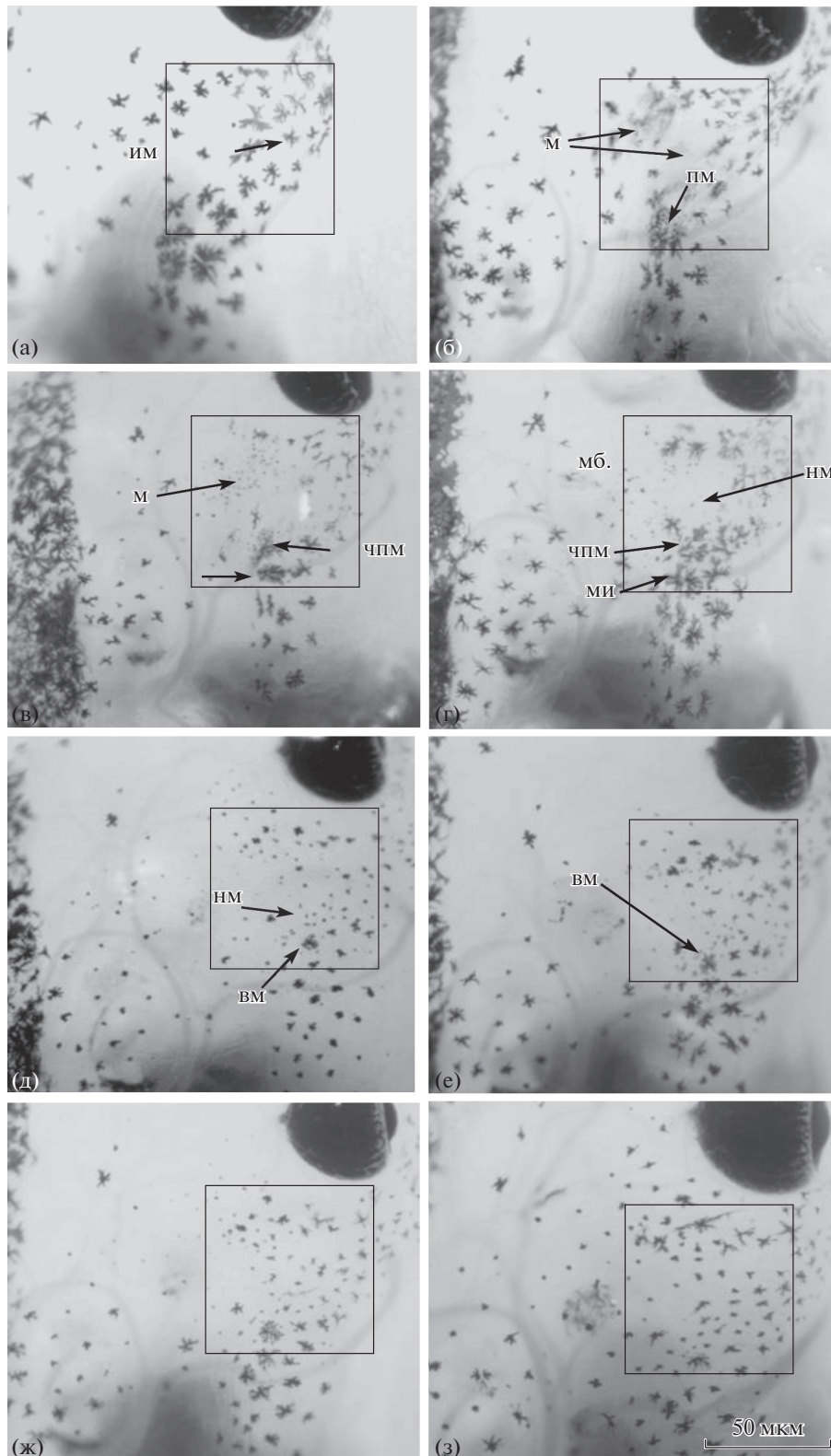


Рис. 2. Динамика восстановления пигментации кожи личинки шпорцевой лягушки, прооперированной на 48 стадии развития. а – до операции, б – по окончании операции, в – 1 день после операции (дпо), г – 3 дпо, д – 5 дпо, е – 7 дпо, ж – 9 дпо, з – 12 дпо: им – интактный меланофор, м – меланосомы из разрушенных меланофоров, мкф – макрофаг с меланосомами, ми – меланофоры, завершившие митотическое деление, нм – новодифференцированные меланофоры, чпм – частично поврежденный меланофор, вм – восстановившийся меланофор.

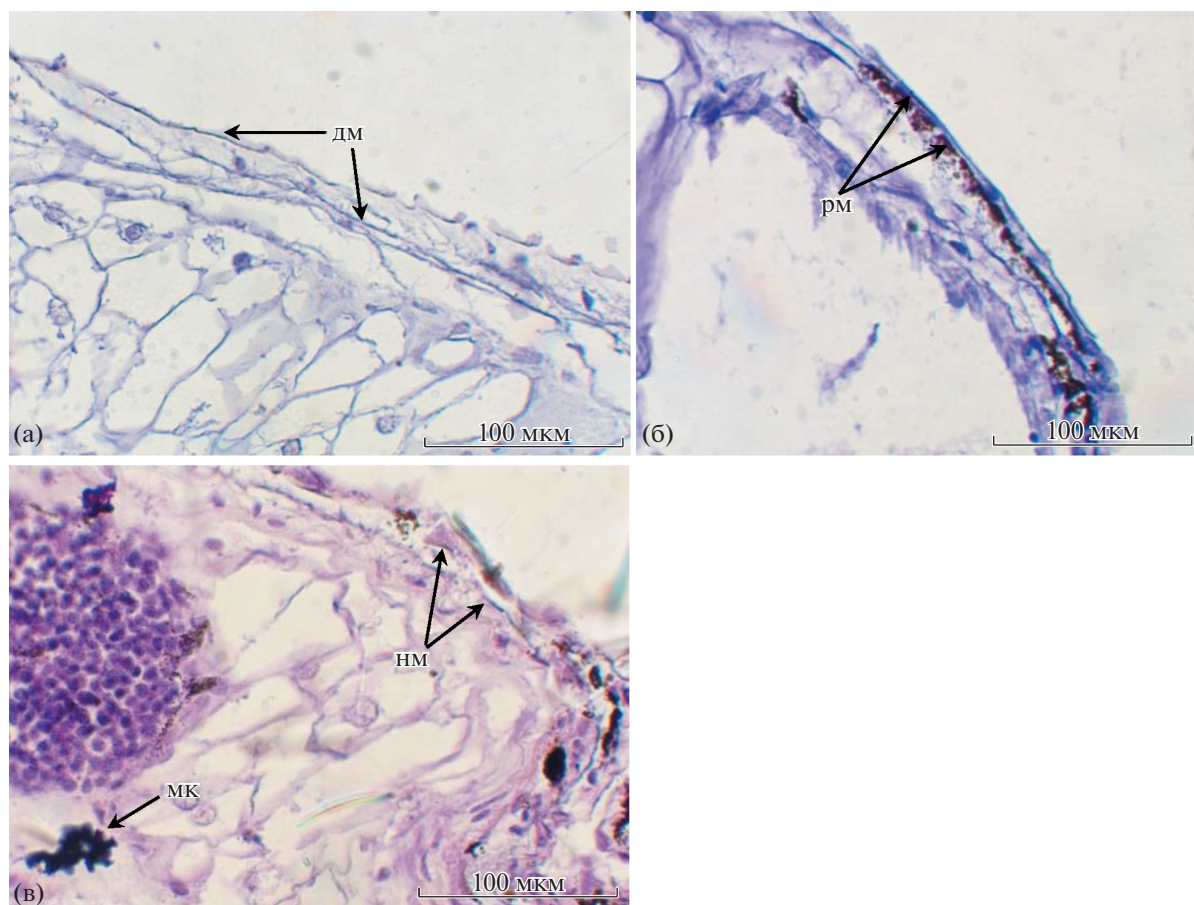


Рис. 3. Поперечный срез личинки шпорцевой лягушки 48 стадии развития в области операции по разрушению меланофоров (см. рис. 1). а – до операции (дм – меланофоры с диспергированными меланосомами); б – на 2-й день после операции (рм – разрушенные меланофоры); в – на 5-й день после операции (мкф – макрофаг с меланосомами, нм – новодифференцированные меланофоры).

появлением отдельных клеток за счет дифференцировки *de novo*, отдельными митозами дифференцированных меланофоров и значительным увеличением размеров самих меланофоров. Группы личинок, прооперированных на 52-й и 56-й стадиях, находились, соответственно, в начале и в конце III-го периода, для которого характерно резкое увеличение численности меланофоров как за счет митозов, так и за счет дифференцировок.

Посттравматическое восстановление пигментации на исследованных стадиях проявило следующую динамику. У личинок группы, оперированной на 46 стадии, число митозов наибольшее

среди всех возрастных групп (рис. 4), но в основном пигментация участка репарировается за счет дифференцировок новых меланофоров. У личинок, оперированных на стадиях 48, обнаружен некоторый спад в восстановлении (таблица) и полное отсутствие митотической активности (рис. 4). У обеих этих групп максимальное увеличение числа пигментных клеток на репарированном участке происходит между 1 и 3 днем. В группах личинок, оперированных на стадии 52, наблюдали наиболее интенсивное восстановление пигментных клеток (таблица) при очень низкой митотической активности дифференцированных

Интенсивность восстановления пигментации на оперированном участке покровов личинок шпорцевой лягушки после разрушения меланофоров, проведенного на разных стадиях развития

Стадии развития личинок в ходе регенерации	46–48	48–51	52–53	56–57
Число меланофоров на оперированном участке относительно контроля через 12 дней после операции (в %)	137.6 ± 4.3	131.3 ± 2.5	151.6 ± 4.2	138.3 ± 3.5

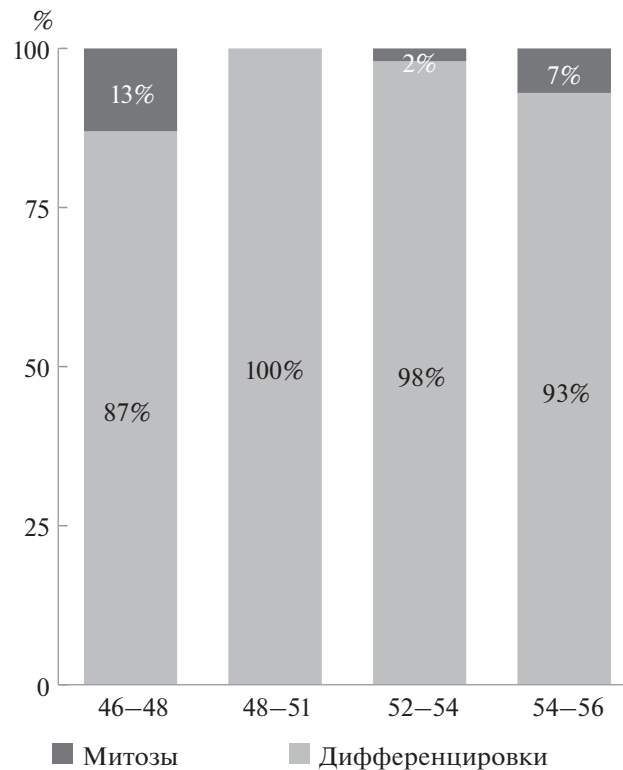


Рис. 4. Восстановление пигментации на оперированном участке личинок *Xenopus laevis* на разных стадиях развития за счет дифференцировки меланоцитов *de novo* и за счет митотических делений неповрежденных меланоцитов.

меланоцитов (рис. 4), а период максимального прироста числа клеток с 3 до 5 дня после операции, т.е. в более поздние сроки. Затем в период позднего прометаморфоза (группа личинок, оперированных на стадии 56) митотическая активность меланоцитов вновь возрастает, но не достигает интенсивности, отмеченной у личинок, оперированных на стадии 46 (рис. 4). Интенсивность восстановления пигментации снижается (таблица), а увеличения числа пигментных клеток не меняется с 3 по 7 день. Таким образом, в процессах репаративного увеличения числа меланоцитов периоды активности наблюдаются с опережением онтогенетической динамики, т.е. репаративные процессы стимулируют более раннюю не только интенсификацию волны дифференцировки, но и повышения митотической активности зрелых меланоцитов.

Выделение участков с различной интенсивностью пигментации (по числу меланоцитов) у шпорцевой лягушки еще в конце прошлого века было подробно описано японскими исследователями (Ohsugi, Ide, 1983). Они показали, что практически полное отсутствие пигментации в определенных участках (над глазами, на брюшной поверхности личинки) не связано с отсутствием в этих участках клеток-предшественников — в культуре кожные эксплантаты с этих участков

способны к развитию меланинсодержащих клеток. Однако и при разрушении отдельных присутствующих в таких зонах меланоцитов нам не удалось “пробудить” процесс пигментации — меланоциты не появлялись в течение всего времени наблюдения. Очевидно, раневого стимулирования репаративных процессов недостаточно для активизации дифференцировки в данных областях. Такое локальное блокирование свидетельствует о сложной системной регуляции процессов, обеспечивающих онтогенетическое развитие и восстановление пигментации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Вассиф Э.Т., Никерясова Е.Н., Захарова Л.А., Голиченков В.А. Изменение размеров дермальных меланоцитов в личиночном развитии шпорцевой лягушки // Вестник МГУ, сер. Биология. 1989. № 3. С. 12–18.
- Джанова В.В., Стародубов С.М., Голиченков В.А. Динамика численности дермальных меланоцитов у личинок *Xenopus laevis* на ранних стадиях развития // Уч. записки Забайкальского государственного гуманитарно-педагогического ун-та им. Н.Г. Чернышевского. Сер. Естественные науки. 2012. № 1. С. 92–97.
- Джанова В.В., Стародубов С.М., Голиченков В.А. Влияние фона стенок контейнеров на пигментацию ли-

- чинок *Xenopus laevis* // Вестник МГУ, сер. Биология. 2012. № 2. С. 7–12.
- Короткова Г.П., Агафонова Л.А. Экспериментально-морфологическое исследование восстановительных нематоды *Pontoneta vulgaris* (Bastian, 1865) // Архив анат., гистол. и эмбриол. 1976. Т. 70. № 3. С. 90–98.
- Молчанов А.Ю., Бурлакова О.В., Голиченков В.А. Структурная организация системы пигментных клеток животных, обеспечивающая ее устойчивость в онтогенезе и эволюции // Сложные системы. 2013. № 4 (9). С. 33–45.
- Молчанов А.Ю., Точило У.А., Виноградская И.С. и др. Репаративные процессы в пигментной системе в период личиночного развития бесхвостых амфибий // Сложные системы. 2014. № 3 (12). С. 47–62.
- Стародубов С.М., Голиченков В.А. Деление дермальных меланофоров амфибий // Доклады Академии наук. 1978. Т. 239. № 4. С. 962–963.
- Стародубов С.М., Голиченков В.А. Митотическое деление дермальных меланофоров личинок бесхвостых амфибий // Доклады Академии наук. 1979. Т. 246. № 3. С. 721–723.
- Nieuwkoop P.D., Faber J. Normal table of *Xenopus laevis* (Daudin). Amsterdam: North-Holland Publ. Co., 1956. 243 p.
- Ohsugi K., Ide H. Melanophore differentiation in *Xenopus laevis*, with special reference to dorsoventral pigment pattern formation // Embryol. Exp. Morph. 1983. V. 75. P. 141–150.
- Yacob J., Lewis A.C., Gosling A. et al. Principles underlying chromatophore addition during maturation in the European cuttlefish, *Sepia officinalis* // Exp. Biol. 2011. V. 214/(Pt 20). P. 3423–3432.

Regeneration of the Skin Pigment System during Larval Development of the Clawed Frog

A. Yu. Molchanov*, O. V. Burlakova, and V. A. Golichenkov

Faculty of Biology, Moscow State University, Moscow, 119234 Russia

**e-mail: alexandermsu@gmail.com*

Received August 29, 2016

We demonstrate regeneration capability of the skin pigment system of clawed frog larvae after local damage to melanophores without skin rupture. The contribution to recovery of pigmentation of the injured area of de novo differentiation of melanophores is compared to contribution of mitotic division of undamaged melanophores localized on the boundaries of the injured area. The regeneration process is observed during various stages of pigment system development of larvae. We establish that, compared to ontogenetic dynamics, pigmentation development in animals is more intense during the regeneration.

Keywords: regeneration, melanophores, pigment system