

5/x

ЛЕНИНГРАДСКИЙ ОРДЕНА ЛЕНИНА И ОРДЕНА ТРУДОВОГО КРАСНОГО
ЗНАМЕНИ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ имени А.А.ДАНОВА

На правах рукописи

Фараг Карам АЗИЗ

ВЛИЯНИЕ ИММУНОДЕПРЕССОРА ЦИКЛОФOSФАМИДА
НА ФОРМООБРАЗОВАТЕЛЬНЫЕ ПРОЦЕССЫ
У АМФИБИЙ

03.00.01 - Эмбриология и гистология

А в т о р е ф е р а т
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Ленинград 1978.

Работа выполнена на кафедре эмбриологии биолого-почвенно-го факультета Ленинградского ордена Ленина и ордена Трудового Красного Знамени государственного университета им. А.А.Ладанова

Научный руководитель -
профессор, доктор биологических наук
Б.П.Токин

Официальные оппоненты:

Старший научный сотрудник,
доктор биологических наук В.Ф.Пучков
Младший научный сотрудник,
кандидат медицинских наук В.В.Худолеев

Ведущее учреждение:

Лаборатория экспериментальной цитологии и гистологии Центрального Научно-Исследовательского института рентгенологии и радиологии МЗ СССР.

Защита состоится " 5 " октября 1978 г. в 15 час. 30 мин. на заседании Специализированного Совета К 078.57.14 по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 08.00.08, 08.00.09, 08.00.11 - зоология, энтомология, эмбриология и гистология в Ленинградском ордена Ленина и ордена Трудового Красного Знамени государственном университете имени А.А.Ладанова

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ЛГУ.

Автореферат разослан " 5 " сентября 1978 г.

Ученый секретарь
Специализированного Совета
кандидат биологических наук

/ А.А.Стекольников/

Научная Библиотека СПбГУ



1000874838

Азиз

7916

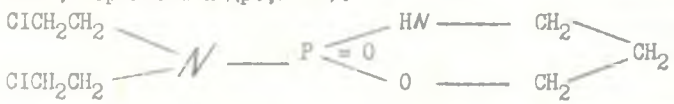


ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ. АКТУАЛЬНОСТЬ ТЕМЫ.

Общезвестны превосходные успехи и неудачи работы хирургов по трансплантации тканей и органов. Возникло много трудных медикобиологических вопросов. Среди этих трудностей на одном из первых мест стоит создание условий для предотвращения отторжения пересаживаемых тканей и органов, происходящего вследствие антигенной реактивности. Медицине пришлось прибегнуть к использованию иммунодепрессоров. Необходимо иметь возможно полную характеристику их влияния не только на иммунную систему, но и на различные структуры и функции организма. Помимо ведущихся в разных лабораториях исследований, необходимы исследования эмбриологов, занятых вопросами соотношения эмбриологии и иммунологии, вопросами регенерации и других восстановительных процессов, происходящих в результате повреждений организма.

На основании теоретических представлений, развиваемых на кафедре эмбриологии Ленинградского университета в связи с разработкой проблемы иммунитета эмбрионов, следует предполагать, что иммунодепрессоры должны оказывать не только влияние на антителообразование, но и на другие защитные механизмы (фагоцитарные и воспалительные реакция) и на формообразовательные процессы, находящиеся в коррелятивной связи с иммунной системой – одного из важных факторов, обуславливающих поддержание гомеостаза, состояния нормальной целостности организма.

В диссертации обосновывается актуальность исследования и выбор для исследования иммунодепрессора циклофосфамида. Циклофосфамид – циклический эфир, относится к классу азотипринов, является алкилирующим цитостатиком (Ларионов, 1962; Горбачева и др., 1977).



Действие циклофосфамида в клетке сводится к алкилированию нуклеиновых кислот, белков и липидов, что приводит к изменениям их структуры, макромолекулярных взаимодействий



79414

32

и нарушениям синтеза ДНК, РНК и белков (Горбачева и др., 1977).

Циклофосфамид оказывает на "покоящиеся" (в фазе *G₀*) и на пролиферирующие клетки действие, подобное облучению (*Brice et al.*, 1966). Предполагается, что препарат активен в течение всего жизненного цикла (онтогении) клетки (Переводчикова, Борисов, 1973). Циклофосфамид - наиболее изученное в иммунологических системах алкилирующее вещество (Утешев, Бабичев, 1974). Этот препарат, по-видимому, угнетает иммунологическую активность за счёт влияния на клетки - предшественники (*Schwartz*, 1965), причем выражена избирательность в отношении депрессии антителообразующих клеток. Так, этот препарат в 100 раз сильнее угнетает иммуногенез, чем эритропоз (*Flaerzschheim*, 1970). Предполагается, что циклофосфамид избирательно элиминирует клетки, пролиферирующие под действием антигена (Фонталин, и др., 1976).

ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ

В целях дополнительной характеристики циклофосфамида, в задачу исследования было поставлено изучение его влияния на формообразовательные процессы хвостатых амфибий, а именно на процессы регенерации тритонов и аксолотлей и на морфо-физиологические процессы, происходящие на стадиях развития головастиков бесхвостых амфибий, предшествующих их метаморфозу.

Целесообразность этого изучения аргументировано в диссертации, а также целесообразность проведенных разведывательного характера исследований о влиянии циклофосфамида на фагоцитарные и воспалительные процессы и о возможном влиянии его на интеграционные механизмы тканей, могущем вызывать атипические разрастания.

Разведывательные опыты в этом (последнем) направлении обусловлены пессимистическими сообщениями о том, что введение иммунодепрессоров в организм почему-то способствует опухолевому росту.

НАУЧНАЯ НОВИЗНА РАБОТЫ

Впервые начато изучение влияния иммунодепрессоров на фор-

мообразовательные процессы у амфибий. Впервые показано, что циклофосфамид тормозит процессы регенерации конечностей у тритонов и аксолотлей. Доказано, что этот иммунодепрессор влияет на морфофизиологические процессы, предшествующие метаморфозу головастика *Xenopus laevis*, вследствие чего наступление его задерживается.

Впервые проведены наблюдения над влиянием циклофосфамида на фагоцитарные и воспалительные процессы и на влияние 7,12-диметилбензантрацена и циклофосфамида вместе с 7,12 диметилбензантраценом на ткани хвостатых амфибий.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ПРАКТИЧЕСКАЯ ЦЕННОСТЬ РАБОТЫ

Теоретической предпосылкой исследований явились следующие положения.

В организме нет структур и функций, имеющих лишь одно единственное значение (Токин, 1955, 1959, 1977). Вероятно, это относится и к иммунной системе.

В ходе эволюции различные морфофизиологические явления возникали и изменялись не обособленно, а в теснейшей взаимозависимости (например, восстановительные процессы и иммунологические состояния и др.). Также и в онтогенезе животных не имеет место совершенно независимого возникновения и развития разных структур и функций.

В ходе онтогенеза возникает новое и новое состояние интеграции, целостности. Эти утверждения относятся, конечно, и к явлениям иммунитета, что обосновано результатами экспериментальных работ о значении иммунитета в формообразовательных процессах.

Результаты экспериментов, сообщаемые в диссертации, вполне согласуются с этими положениями. Получены новые доказательства взаимозависимости восстановительных процессов и иммунологических явлений, влияния иммунодепрессора на регенерацию, на возможность (в определенных условиях экспериментирования) изменения нормальной интеграции тканей.

Из указанного теоретического значения работы вытекает и её практическое значение, поскольку дополнительная (к из-

вестному) характеристика иммунодепрессоров может иметь значение для практики медицины при использовании циклофосфамида для подавления антагонной реактивности.

Сопоставление полученных на амфибиях материалов с данными о влиянии иммунодепрессоров на иммунную систему птиц и млекопитающих, вероятно, окажется полезным эмбриологам, иммунологам и другим специалистам для дальнейших исследований в интересах медицины.

АПРОБАЦИЯ РАБОТЫ

Результаты исследований пять раз сообщались на заседаниях кафедры эмбриологии Ленинградского университета.

ПУБЛИКАЦИИ

По материалам диссертации опубликована одна работа и одна находится в печати.

ОБЪЕМ И СТРУКТУРА ДИССЕРТАЦИИ

Диссертация состоит из введения и трех глав, излагающих результаты исследования. В конце диссертации излагаются выводы и дается список цитированной литературы, включающий 102 публикации, из них 53 советских авторов и 49 ученых других стран. Диссертация изложена на 134 страницах машинописного текста. Работа иллюстрирована 50 рисунками и 11 таблицами. В отличие от традиционной структуры диссертаций, одного общего обзора литературы не дается, также как и общего для всей диссертации обсуждения полученных результатов. Ссылки на литературу и обсуждение результатов даются в каждой из глав, посвященных разным формообразовательным процессам. Основные выводы даются в конце диссертации.

СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ.

ВЛИЯНИЕ ЦИКЛОФОСФАМИДА НА РЕГЕНЕРАЦИЮ КОНЕЧНОСТЕЙ У АКСОЛОТЛЯ И ТРИТОНА (гл. I диссертации)

Литературные данные. В научной литературе имеется очень мало сведений о влиянии циклофосфамида на регенерацию животных, к тому же эти сведения касаются только млекопитающих и птиц. Не удалось обнаружить ни одной работы на амфибиях. Выяснено (*Cohen et al.*, 1975), что циклофосфамид

ухудшает заживление кожных ран у мышей.

М.Манн, Б.Беднар, Ж.Фейт (*Mann M, B. Bednar, J. Feit,* 1977) также констатировали замедление сроков эпителизации ран и изменения реакции фибробластов (в опытах на мышах и крысах). При регенерации кожи у эмбрионов курицы циклофосфамид вызывает задержку в эпителизации раны, уменьшается толщина и плотность образующейся грануляционной ткани (Балахонов, 1979). Опубликованы наблюдения о влиянии циклофосфамида (*Miotkiewski et al.*, 1973) на процессы регенерационной гипертрофии печени у крыс. Эти немногие литературные данные свидетельствуют, однако, о влиянии циклофосфамида на регенерацию.

Материал и методика

Основная часть наших исследований была проведена на тритонах *Triturus cristatus*. Всего использовано 190 тритонов, а также поставлены опыты на 17 аксолотлях.

Ампутировались кисть и предплечье передней правой конечности. Подопытным животным через различные сроки (сразу после операции, через 1, 2 и 7 дней) подкожно один раз вводился в различных концентрациях (5, 20, 40 мг/кг) циклофосфамид в физиологическом растворе. Контрольным животным вводился физиологический раствор.

Для гистологических наблюдений (в разные сроки в течение четырех месяцев) конечность у контрольных и подопытных животных фиксировалась в жидкости Буэна.

Применялась парафиновая заливка объектов. Продольные срезы толщиной 6-8 микрон окрашивались гематоксилином с докраской эозином.

Результаты наблюдений

Прижизненные наблюдения за регенерацией у аксолотлей (введение циклофосфамида в дозе 20 мг/кг) проводились в течение 16 месяцев после операции. Минуя подробности результатов наблюдений, следует отметить, что циклофосфамид в дозе 20 мг/кг при подкожном введении взрослым аксолотлям вызывает определенные изменения в ходе регенерации: задержка в формировании пальцев, изменение (по сравнению с контролем) длины

и толщины предплечья. Эти изменения стойкие: даже через 16 месяцев после операции регенерировавшая конечность у подопытных животных имела ненормальный вид, пальцы плохо развиты, отсутствует между ними мембрана, конечность "вывернута".

Наблюдения за регенерацией у тритонов
(*Triturus cristatus*)

В таблице № I представлено количество животных с нормальным и уменьшенным числом пальцев у контрольных и подопытных тритонов вне зависимости от дозы и времени введения циклофосфида.

В гистологических наблюдениях за регенерацией передней правой конечности у тритонов не обнаружено специфических различий в гистогенетических процессах, сопровождающих регенерацию у подопытных животных по сравнению с процессами регенерации у контрольных. Можно отметить лишь, что эпидермис кожи в регенерировавших конечностях подопытных животных обычно более тонкий, имеется меньшее число слоев, чем в эпителии кожи контрольного. Мышцы регенерировавших конечностей у подопытных животных, как правило, менее развиты. Пальцы у подопытных животных нередко сближены в большей степени, чем у контрольных животных. Среди других анатомических отличий следует отметить, что число фаланг пальцев часто меньше в регенерирующих конечностях подопытных животных.

О ЗАДЕРЖКЕ НАСТУПЛЕНИЯ МЕТАМОРФОЗА У АМФИБИИ ПОД
ВЛИЯНИЕМ ЦИКЛОФОСФАМИДА И ПРИ ИНЫХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ
ВОЗДЕЙСТВИЯХ (гл. II диссертации)

Обоснование темы и литературные данные

Как уже говорилось, исходное предположение при проведении наших опытов с иммунодепрессорами заключалось в том, что они как-то должны влиять не только на собственно иммунную систему, но и на морфофизиологические процессы, связанные с иммунологическими реакциями. Что касается циклофосфида, то он является цитостатическим препаратом и способен

Таблица I.

Количество животных с нормальным или уменьшенным количеством пальцев в опыте и контроле (суммарная таблица)

Варианты опытов	Количество животных с нормальным числом пальцев	Количество животных с уменьшенным числом пальцев
Подопытные: Циклофосфамид раствор	20 (32%)	43 (68%)
Контроль : Физиологический раствор	6 (46%)	7 (54%)

оказывать влияние не только на иммунокомпетентные клетки. Мы заинтересовались вопросом - оказывает ли циклофосамид влияние на процессы, предшествующие метаморфозу. Укажем на некоторые из причин, побудивших экспериментировать в этом направлении.

Как известно, многие морфо-физиологические преобразования, совершающиеся при метаморфозе, превосходно изучены. Большой интерес представляют исследования роли иммунологических реакций в процессах метаморфоза. Еще И.И.Мечников (1883) и А.О.Ковалевский (1887) обнаружили значение фагоцитарных реакций в ходе метаморфоза амфибий и метаморфоза у мух. Превосходные исследования в этом направлении проведены рядом исследователей, в особенности Алёшиным Б.В. (1936), который процессы резорбции хвоста головастика амфибий рассматривал как воспалительный процесс. Происходит альтерация тканей, характерная для воспалительных процессов сосудистая реакция, фагоцитоз отмирающих клеток. Уже одни эти факты о роли иммунологических реакций в процессах метаморфоза служат основанием для постановки опытов о влиянии иммунодепрессоров на метаморфоз амфибий. К тому же и наши собственные исследования на головастиках *Bufo regularis* Reuss привели к необходимости опытов с иммунодепрессорами.

Материал и методика

Ляба *Bufo regularis*, как объект экспериментов по регенерации, хорошо изучена М.Михазлем и Н.Эльмалхом (Michael M., N. Elmalkh, 1968, 1969). Мы попытались вызвать восстановление регенерационной способности задних конечностей головастиков, ампутируя их на уровне 1/3 бедра. Всего под опытом было 707 головастиков, из них на 134 изучались гистогенетические процессы, происходящие после ампутации. Сообщим только результаты опытов на стадиях 56 и 57 (по Sedra S., M.T. Michael, 1961). Некоторые анатомические признаки, характерные для этих стадий таковы. Стадия 56 (возраст 28 дней): общая длина головастика 25 мм; задняя конечность около 2 мм длины с ясно выраженным ко-

ленным суставом; ступня имеет пять пальцев и рудиментарный палец, четвертый палец немного длиннее других. Стадия 57 (возраст головастиков 30 дней): общая длина 26,5 мм; задняя конечность около 2,5 мм длины. Все части конечности пропорционально сформированы. Длина четвертого пальца в три раза превышает его ширину. Стадия 57-я непосредственно предшествует метаморфозу. Регенерация задних конечностей на этой стадии не происходит.

Изучалось влияние ряда веществ. Сообщаем данные о влиянии $\text{NaClO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0,05% концентрации). После ампутации конечности головастики помещались на 7-10 дней в раствор перхлората натрия, после чего они переносились в воду, в которой находились до фиксации для гистологического изучения.

Для гистологического исследования оперированные конечности фиксировали в жидкости Буэна или 10% формалином на 1, 2, 4, 6, 10 и 12 дни, после ампутации конечности декальцинировали. Окрашивали тотально борным кармином, обезжировали в спиртах, закаливали в парафин. Продольные срезы - 8 мкм. Докраска пикро-индиго кармином.

В диссертации излагаются результаты внешне-морфологических и гистологических наблюдений; даются фотоснимки регенерирующих конечностей и фотоснимки гистологических препаратов. Подробности в автореферате невозможно сообщить. Основные факты таковы. Головастики продолжают оставаться в личиночном состоянии в течение долгого времени не только во время содержания их в растворе $\text{NaClO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, но и впоследствии. Не касаясь вопросов о механизме действия перхлората натрия, напомним, однако, что это антищитовидное вещество. Под его влиянием нарушается функция щитовидной железы. Известно, что процессы метаморфоза у бесхвостых амфибий осуществляются при нормальной деятельности этой железы.

Под влиянием перхлората натрия отодвигается наступление метаморфоза, тем самым сохраняются и нормальные морфо-физиологические условия для прохождения процесса регенерации. Гистологическое изучение дало возможность убедиться в том,

что после ампутации конечности может происходить нормальное формирование регенерационной бластымы у апикальной части регенерата.

Благодаря задержке наступления метаморфоза "восстанавливается" регенерационная способность задних конечностей головастика, точнее сказать, сохраняется в некоторой степени регенерационная способность. Не во всех случаях, однако, происходит регенерация. В опытах на стадии 56-й из 29 головастиков только в одном случае произошла полная регенерация конечности с 5-ю пальцами и одним рудиментарным пальцем. В других случаях сформировались конечности с четырьмя пальцами, в четырех случаях - с тремя, в пяти случаях произошла только регенерация бедра и части голени. У 17-ти головастиков регенерация отсутствовала.

В опытах с головастиками на стадии 57-й в 16 случаях регенерация не происходила. В двух случаях регенерировала конечность с 5-ю пальцами, в одном случае - с 4-мя пальцами, в одном случае - с 3-мя, а в четырех случаях - с 2-мя пальцами. О результатах всех опытов можно сделать вывод: при задержке наступления метаморфоза в той или иной степени сохраняется регенерационная способность у задних конечностей головастиков жабы

ЗАДЕРЖКА В НАСТУПЛЕНИИ МЕТАМОРФОЗА У ГОЛОВАСТИКОВ

Xenopus laevis ПОД ВЛИЯНИЕМ ЦИКЛОСФАМИДА

Никаких данных в научной литературе по этому вопросу найти не удалось. Вследствие этого, естественно, пришлось преодолеть ряд трудностей методического порядка, в целях создания необходимых условий экспериментирования, в частности, решить вопрос о дозах циклофосамида, о длительности воздействия их на головастиков.

В первой серии наших совместно с А.В.Балахоновым экспериментов использовались три группы головастиков *Xenopus laevis* на стадии 51 (по Nieuwkoop, Faber, 1956). В каждой группе 18 особей.

1-я группа служила контролем, животные содержались в

отстойной воде.

2-я и 3-я группы головастиков помещались на два часа ежедневно в течение трех суток в раствор циклофосамида. Всего таким образом головастики подвергались воздействию иммунодепрессора в течение шести часов.

Для животных 2-й группы применялся раствор в концентрации I мг/мл, а для животных 3-й группы - 2 мг/мл. В последующие дни все подопытные головастики содержались в отстойной воде. Скорость метаморфоза определялась по прорезанию передних конечностей, по формированию дефинитивных признаков головы и по резорбции хвоста. Результаты опыта приведены в таблице 2. Приведены данные завершающих этапов наблюдений. Цифры в графах таблицы означают количество животных, приобретших к определенному сроку указанные признаки.

Во второй серии экспериментов использовались головастики на стадии 57-58, по 20 особей в группе.

I-я группа служила контролем, 2-я группа была помещена в раствор циклофосамида концентрации I мг/мл на 48 часов.

Результаты этой серии экспериментов представлены в таблице 3.

Уродливых зародышей ни в первой, ни во второй сериях опытов не было.

Каковы основные результаты экспериментов ?

Выяснилось, что наступление метаморфоза у подопытных головастиков по сравнению с контрольными задерживается. Ко времени завершения того или иного этапа метаморфоза у контрольных животных, в опыте наблюдается статистически достоверная задержка этих этапов при использовании циклофосамида в дозе I мг/мл (суммарная экспозиция воздействия 6 часов). Разница между количеством контрольных головастиков, полностью завершивших определенную фазу метаморфоза, и количеством подопытных, завершивших ту же фазу лишь частично, составляет около 40%, а при использовании циклофосамида в дозе 2 мг/мл в результате воздействия в течение 6 часов - более 50%.

Помещение головастиков в раствор циклофосамида на более

Таблица 2

Прохождение процесса метаморфоза головастиков *Xenopus laevis*
после действия циклофосфамида. Опыты на стадии 5I

Этапы метаморфоза Варианты опытов		Завершение формирования передних конечностей			Формирование дефинитивной головы			Резорбция хвоста		
		через 35 дней после воздействия	через 43 дня	через 57 дней	через 47 дней	через 54 дня	через 65 дней	через 54 дня	через 64 дня	через 68 дней
Циклофосфамид	1 мг/мл	4(22%)	7(39%)	11(61%)	5(28%)	7(39%)	11(61%)	5(28%)	8(44%)	11(61%)
	2 мг/мл	3(17%)	5(28%)	8(44%)	4(22%)	5(28%)	8(44%)	3(17%)	6(33%)	8(44%)
КОНТРОЛЬ		7(39%)	15(83%)	18(100%)	9(50%)	17(94%)	18(100%)	10(56%)	17(94%)	18(100%)

ПРИМЕЧАНИЕ: 1. В каждой группе 18 животных

2. Цифры в таблице - количество животных завершивших определенный этап метаморфоза

Таблица 3

Прохождение процесса метаморфоза головастиков *Xenopus laevis*
после действия циклофосфамида. Опыты на стадии 57-58

Этапы метаморфоза Варианты опытов		Завершение формирования передних конечностей			Формирование дефинитивной головы			Резорбция хвоста		
		через 5 дней после воздействия	через 10 дней	через 15 дней	через 12 дней	через 16 дней	через 23 дня	через 19 дней	через 22 дня	через 28 дней
Циклофосфамид	1 мг/мл	1(5%)	15(75%)	18(90%)	4(20%)	12(60%)	19(95%)	5(25%)	14(70%)	18(90%)
	КОНТРОЛЬ	3(15%)	15(75%)	20(100%)	5(25%)	13(65%)	20(100%)	5(25%)	14(70%)	20(100%)

ПРИМЕЧАНИЕ: 1. В каждой группе 20 животных

2. Цифры в таблице - количество животных завершивших определенный этап метаморфоза

поздних стадиях развития даже и при большей длительности воздействия (см. табл. 3) не дает также резких различий между контролем и опытом, задержка в развитии очень невелика, достоверность её низкая.

Эти и другие факты, приводимые в диссертации, позволяют утверждать, что иммунодепрессор циклофосфамид влияет не только собственно на иммунную систему, но и на коррелированные с нею системы.

Уверенность в этом выводе подкрепляется и некоторыми литературными данными.

Так, Р. Вебер (*Weber R.*, 1965) и другие авторы, цитируемые в его статье, обнаружили торможение процесса метаморфоза у головастиков *Xenopus laevis* актиномицином Д, обладающим иммунодепрессивными свойствами.

О ДАЛЬНЕЙШИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ ВЛИЯНИЯ ИММУНОДЕПРЕССОРА НА ФОРМОБРАЗОВАТЕЛЬНЫЕ ПРОЦЕССЫ У АМФИБИИ (гл. III диссертации)

А. Наблюдения над фагоцитарными и воспалительными

реакциями

Обсуждение
В диссертации обоснована необходимость изучения влияния циклофосфамида не только на антигенную реактивность, но и на фагоцитарные и воспалительные реакции.

Излагается и разведывательного характера собственные эксперименты на взрослых тритонах (*Triturus cristatus*).

Ампутировали стопу задней конечности. Через 7 дней протекающей регенерации в апикальную часть регенерата с помощью тонкой иглы, покрытой растертой тушью, вводили инородные для тканей частицы туши. Одновременно с этим оперированным тритонам подкожно вводили 0,1 мл раствора циклофосфамида в концентрации 20 мг/кг.

Контрольными служили тритоны, подвергнутые тем же манипуляциям, но им вместо циклофосфамида вводился физиологический раствор. Через 7 дней, а в других случаях через 10 дней после введения туши и циклофосфамида регенерирующие конечности фиксировали в жидкости Буэна, приготавливали парафиновые срезы толщиной 7 мкм, которые окрашивали красновым гематоксилином Майера с докраской эозином.

в других опытах регенераты фиксировались через 10 дней после введения туши и циклофосфамида.

Проведены и иные опыты.

Результаты опытов дают ориентировочный материал, позволяющий наметить дальнейшие эксперименты.

Дополнительно к исследованиям, результаты которых сообщены в I-й главе, мы убедились в том, что под влиянием циклофосфамида происходит торможение процессов регенерации. Гистологические наблюдения соответствуют описанным внешним морфологическим наблюдениям над регенерацией. Способность к развитию воспалительной реакции и к фагоцитозу отдельными клетками инородных частиц сохраняется и при введении в ткани циклофосфамида. Она выражается в сосудистой реакции, гиперемии капилляров, в отеке тканей регенерата, в инфильтрации лейкоцитов в ткани регенерата и в удалении ^{от} него тканей.

Б. Разведывательные опыты по вопросу: не способствует ли циклофосфамид атипическим разрастаниям тканей ?

Имеются экспериментальные и клинические данные, свидетельствующие о том, что иммунодепрессоры каким-то образом способствуют возникновению и развитию злокачественных новообразований у животных и человека (Горелик, 1975).

На основании анализа литературы о соотношении опухолевых процессов и регенерационной способности, а также на основании того, что иммунная система является одной из интегрирующих систем, ответственной за поддержание нормальной интеграции тканей и всего организма - были поставлены разведывательные опыты с циклофосфамидом. Минувя многие подробности поставленных опытов, можно сказать таким образом об основных фактах. Е.Г.Агаповой и Б.П.Токину (1968) не удалось получить на аксолотлях канцерогенный эффект ни при помощи канцерогенных углеводов, ни под влиянием рентгеновских лучей, которые, кстати сказать, относятся к факторам, способным снижать антигенную реактивность. Однако сочетание их воздействие на организм привело к возникновению атипических разрастаний, которые можно рассматривать как опухолевый процесс. Токин Б.П. (1942, 1959); Токин Б.П. и

Филатова А.Г. (1958) объясняют это на основании гипотезы об "антагонистичности" явлений регенерации и бластоматозного роста. В диссертации излагается эта гипотеза и различные эксперименты, проведенные на её основе.

В наших разведывательного характера опытах на аксолотлях подкожно вводился циклофосфамид в дозе 20 мг/кг и канцероген 7,12 диметилбензантрацен в дозах 0,1 мг в случае молодых животных и 0,2 мг в случаях старых. Контрольным аксолотлям вводился только канцероген таким же образом и в тех же дозах. Ранее было установлено, что циклофосфамид сам по себе в условиях наших опытов не вызывает атипических разрастаний. Указанное канцерогенное вещество также в условиях наших опытов не обуславливало канцерогенный эффект.

Длительными (до 8 месяцев) наблюдениями выяснено, что сочетанное действие циклофосфамида и канцерогена вызывает в некоторых случаях появление опухолевидных образований и гибель животных.

Гистологическое исследование ни в одном случае не обнаружило инфильтративного роста и совершенно очевидной картины бластоматозного роста, однако, при комбинированном действии канцерогенного вещества и иммунодепрессора имели место атипические разрастания эпителия кожи, описываемые в диссертации. Обнаруженные факты интересны, но необходимо проявить большую осторожность в выводах и рассматривать проведенные эксперименты только как весьма предварительные.

ОБСУЖДЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Диссертация посвящена изучению влияния иммунодепрессора циклофосфамида на формообразовательные процессы у амфибий.

Результаты всех экспериментов, о которых сообщается в диссертации, нам думается, оказались новой иллюстрацией правильности исходных теоретических положений, на основании которых была определена тематика диссертации и методические приемы. В ходе эволюции различные мор-

физиологические явления, как правило, возникали и изменялись не обособленно друг от друга, а в теснейшей взаимозависимости. Также и в онтогенезе животных и человека различные структуры и функции возникают и изменяются при их теснейшем взаимодействии, так как **В ходе онтогенеза возникает** новое и новое состояние целостности.

В организмах вообще нет структур и функций, имеющих лишь одно единственное значение.

Данные наших экспериментов позволяют сделать следующие основные выводы :

1. Все испытанные дозы циклофосфамида (в частности 20 мг/кг) при подкожном введении его в брюшную часть тела тритона *Triturus cristatus* (одновременно с ампутацией и в разные сроки после ампутации) вызывают изменения нормального хода регенерации, особенно сказывающегося на формировании пальцев. Всего под опытом было 190 тритонов и 17 аксолотлей.

В гистологическом исследовании не удалось обнаружить каких-либо закономерностей изменений в поведении клеток и тканей в ходе регенерации конечности тритона под влиянием циклофосфамида.

Циклофосфамид в дозе 20 мг/кг при подкожном введении аксолотлям влияет на процессы регенерации конечности. Даже спустя очень длительное время (до 16-ти месяцев) после ампутации регенерировавшие конечности подопытных животных имели те или иные отклонения от нормы: плохо развиты пальцы, отсутствует мембрана между ними, конечность может оказаться "вывернутой".

2. Известно, что у головастика бесхвостых амфибий в определенном периоде перед метаморфозом утрачивается способность к регенерации конечностей. В большом числе опытов нами доказана возможность "восстановления" регенерационной способности задних конечностей головастика кабы *Bufo tegulatus* на той стадии личиночного развития, когда (перед метаморфозом) эта способность утрачивается. Всего под опытом было 707 головастика, из них на 134-х изучались гисто-

генетические процессы, совершающиеся после ампутации конечности и обработки соответствующими веществами.

Воздействие $\text{NaClO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ и другими веществами обуславливает возможность регенерации задних конечностей головастика и на той стадии их жизни, когда регенерационная способность теряется.

Механизм влияния, повидимому, связан с тем, что нарушается функция щитовидной железы, играющая, как известно, большую роль в осуществлении процессов метаморфоза.

Действительно, под влиянием перхлората натрия наступление метаморфоза головастика *Bufo regularis* задерживается.

Принципиально тот же результат получен нами в опытах по влиянию циклофосфида на головастика *Xenopus laevis*. Контрольные головастики развивались в отстойной воде. Подопытные головастики помещались ежедневно (в течение трех дней) на 2 часа в раствор циклофосфида. Таким образом они подвергались воздействию иммунодепрессора всего в течение шести часов. В дальнейшем головастики содержались в отстойной воде. При этом одна группа головастика подвергалась воздействию циклофосфида в концентрации 0,1 мг/мл, а другая — в концентрации 1 мг/мл.

Всего под опытом было 118 головастика.

Результаты опытов: наступление метаморфоза у подопытных головастика задерживается (см. табл. 2). Так, у 60% контрольных головастика произошло завершение формирования передних конечностей и ни у одного из подопытных головастика передние конечности еще не появились. В то время как у 60% контрольных животных произошло формирование definitivaльной головы, у подопытных это осуществилось только в 20% случаев. Принципиально то же дали наблюдения и над резорбцией хвоста.

3. Проведены предварительные опыты (глава 3 диссертация) о влиянии циклофосфида не только на антигенную реактивность, но и на иные иммунологические реакции — фагоцитоз и воспаление.

У взрослых *Triturus cristatus* ампутировалась стопа задней конечности. Через 7 дней протекания регенерации в аппикальную часть регенерата вводили тонкой иглой, покрытой

растертой тушью, инородные для тканей частицы туши. Одновременно вводили 0,1 мл раствора циклофосфида в концентрации 20 мг/кг. Контрольными служили тритоны, подвергнутые тем же манипуляциям, но им вместо циклофосфида вводили физиологический раствор.

Общий вывод из всех наблюдений заключается в том, что под влиянием циклофосфида, во-первых (как это было уже доказано опытами, результаты которых изложены в главе I) наблюдается торможение процессов регенерации. Способность к развитию воспалительной реакции и к фагоцитозу при введении в ткани циклофосфида сохраняется, однако, пока преждевременно сравнивать её с тем, что происходит без введения иммунодепрессора.

4. Проведены опыты по совместному действию канцерогенного вещества (7,12 диметилбензантрацен) и циклофосфида на ткани аксолотля (гл. III диссертации). Контрольными животными служили аксолотли, которые подвергались воздействию только канцерогенного вещества. Всего под опытом было 18 молодых и 18 старых аксолотлей.

Прижизненные наблюдения проводились в течение 8 месяцев. У погибших животных фиксировались ткани в районе опухолевидных разрастаний. У подопытных животных в районе введения канцерогена имело место возникновение "вздутый", опухолевидных разрастаний.

В диссертации сообщаются данные гистологического исследования, свидетельствующие об атипических разрастаниях; инфильтративный рост тканей не обнаружен. Нельзя сделать вывод о возникновении опухолей. Однако материалы предварительных опытов настоятельно диктуют необходимость проведения специального исследования в интересах онкологии.

5. Мы надеемся, что полученные нами данные на амфибиях окажутся полезными для эмбриологов, иммунологов и хирургов, занятых исследованиями влияния иммунодепрессоров на иммунную систему (и коррелированные с ней системы) у птиц и млекопитающих.

Работы

опубликованные по теме диссертации

1. Балахонов А.В., Азиз Ф.К. 1979. О задержке наступления метаморфоза у головастика *Xenopus laevis* под влиянием циклофосамида. Вестник ЛГУ (в печати).
2. Michael M.I., Aziz F.K. 1976. Effect of Sodium perchlorate on the restoration of the limb regenerative ability in a metamorphic stage of *Bufo regularis* Reuss. *Folia Biol. (Kraków)* 24 (3): 309-315.

Подписано к печати 31.08.78
Зак.228 Тир.110 Объем I^I/2 пл.
Бесплатно. ФОЛ ЛГУ
199164, Л-д, наб.Макарова, д.6

