

5. Parry D. A. Structure and function of the gut in Spadella and Sagitta. — Journ. Marine Biol. Ass. U. K., 1944, v. 26, p. 16.
6. Reeve M. R., Cosper T. C., Walter M. A. Visual observations on the process of digestion and production of faecal pellets in the Chaetognath Sagitta hispida Conant. — Journ. Exptl. Marine Biol. and Ecol., 1975, v. 17, № 1, p. 39.

Рекомендована Мурманским морским биологическим институтом. Поступила 28 декабря 1979 г.

УДК 591.169.2:591.39

ЗАЖИВЛЕНИЕ КОЖНЫХ РАН У 16-ДНЕВНЫХ ЭМБРИОНОВ КУР В НОРМЕ И ПОД ВЛИЯНИЕМ ИММУНОДЕПРЕССОРА ЦИКЛОФОСФАНА

А. В. Балахонов

Исследовали процессы, протекающие в коже эмбрионов кур после нанесения им линейной полнослойной кожной раны на 16-й день инкубации. Описаны изменения, наблюдающиеся в эпидермисе и соединительной ткани в течение первых 4 суток заживления в контроле и в опыте. У контрольных зародышей рана полностью покрывается эпителием через 3 суток; циклофосфан вызывает задержку этого процесса. Кроме того, циклофосфан изменяет толщину и плотность грануляционной ткани — у подопытных животных она толще и менее плотная, чем в контроле. У подопытных зародышей уменьшается количество лейкоцитов в районе раны, меньше образуется кровеносных сосудов в грануляционной ткани.

В организме нет структур и функций, имеющих одно единственное значение [5]. Это положение в полной мере можно отнести к системе иммунитета, которая осуществляет не только защитную функцию. Развитие тех или иных иммунологических свойств тесно связано с различными формообразовательными процессами. Лимфоидную ткань можно отнести к одной из наиболее действенных регулирующих систем организма, а иммунокомпетентные клетки — к одним из важнейших регуляторов клеточного деления [1, 7].

Применением химических иммунодепрессивных препаратов можно подавлять иммунологические явления в организме. Тем самым можно в какой-то степени разорвать связь между иммунитетом и формообразовательными процессами, в частности регенерацией. Помимо этого, иммунодепрессоры, например цитостатические агенты, могут воздействовать на восстановление непосредственно, влияя на пролиферирующие клетки соединительной или эпителиальной ткани.

Для возможно более полного представления о действии на организм веществ, подавляющих иммунитет, необходимо знать, как они влияют на иммунную систему и на иные структуры и процессы в организме. Несомненно, что проблеме следует решать в филогенетическом и онтогенетическом аспектах.

Нас интересовало, как влияет на заживление кожных ран у 16-дневных эмбрионов кур породы белый леггорн иммунодепрессор циклофосфан, широко применяемый в медицинской практике. В литературе [9] имеются сведения о том, что это вещество ухудшает заживление хирургических ран кожи у мышей. Под влиянием циклофосфана изменяется реакция фибробластов в ране [12].

К 16-му дню инкубации кожа эмбриона курицы начинает приобретать диффинитивное состояние. При нормальном развитии к 16-му дню кожа зародыша имеет следующую структуру [6]: эпидермис представлен базальным, переходным и апикальным слоями клеток. Более или

менее однородные слои дермы (подэпителиальный, средний и адипозный) после 16 дней инкубации утолщаются и начинают все более отличаться друг от друга по клеточному составу и межклеточному веществу. Кровеносная и лимфатическая системы у 16-дневных эмбрионов уже достаточно развиты, клеточные элементы крови представлены всеми видами клеток, но в иных соотношениях и количестве, чем у взрослых кур [4].

Методика

На 16-й день инкубации, приблизительно в одно и то же время суток, в стерильных условиях яйцо вскрывали со стороны воздушной камеры. Контрольным животным в кровеносный сосуд или в желточный мешок вводили 0,3 мл физиологического раствора. Подопытным животным таким же способом один раз вводили свежерастворенный циклофосфан в дозе 30 мг/кг. Затем сразу надрезали зародышевые оболочки и ножницами наносили линейную полнослойную кожную рану длиной 6—8 мм, глубиной 1 мм на наружной стороне крыла у его основания. После операции «окошечко» в скорлупе заклеивали, и яйцо ставили на дальнейшую инкубацию. Через 2, 4, 18, 24, 44, 48, 72 и 96 ч (по 3—4 зародыша на каждый срок) яйца вторично вскрывали и оперированные кусочки крыла фиксировали в жидкости Буэна. Поперечные срезы через рану толщиной 5—7 мкм окрашивали гематоксилин-эозином или азур-эозином. Митозы в эпидермисе подсчитывали по 5 срезам на зародыш в языках (утолщенные края регенерирующего эпидермиса, всего около 600 клеток), прилежащих к ране (длиной приблизительно 50 клеточных диаметров, или 1,6 мм, всего около 1200 клеток) и удаленных от раны (длиной приблизительно 100 клеточных диаметров, или 3,2 мм, всего около 2400 клеток). Митозы в эпидермисе, окружающем перьевую сумку, не учитывали.

Заживление раны у контрольных животных

Репаративная регенерация кожи эмбрионов кур 16-го дня инкубации описана нами ранее [3]. Поэтому остановимся лишь на основных моментах заживления раны у контрольных животных.

Эпидермис. Сразу после операции рана приобретает вид вогнутой дуги, края раны расходятся на расстояние 1,8—2 мм. К 18—24 ч после нанесения надреза концы регенерирующего эпидермиса (языки) булавовидно утолщаются, расстояние между ними составляет 70—80 % от исходного (1,2—1,4 мм). Пролиферативная активность эпидермиса к исходу первых суток в прилежащих к ране районах составляет 3,3—3,4 %, в удаленных от раны районах — 1,6—1,7‰; в языках митозов не найдено. Первые митотически делящиеся клетки в эпидермальных языках отмечены к 44—48 ч после операции; их количество достигает 4,0‰. К этому же сроку в прилежащих к ране районах эпидермиса митотическая активность составляет 2,9‰, а в удаленных районах — 1,7—1,8 ‰.

К 44 ч ширина раны составляла не более 0,6—0,7 мм, а к 48 ч у одного из зародышей это расстояние было 5—10 клеточных диаметров, у других — несколько больше (0,4—0,5 мм). Через 3 суток после нанесения надреза рана эпителизирована полностью. Сомкнувшийся эпидермис утолщен в 2—3 раза по сравнению с интактными районами. В ряде случаев регенерировавший эпидермис образовывал плавные складки, типичные для нормальной кожи. К 72—96 ч митотическая активность эпидермиса, прилежащего к ране, снижалась до 1,5—1,6‰, в утолщенной части количество митозов достигало 4,0 ‰.

Соединительная ткань. С первых часов после нанесения надреза в области раны развивается воспалительная реакция. Повышается проницаемость стенок сосудов, из крови в ткань выселяется значительное количество зернистых лейкоцитов. К 18—24 ч у поверхности скапливается большое количество гранулоцитов, образующих здесь лейкоцитарный вал. Вслед за гранулоцитами в область раны перемещаются различные формы лимфоцитов. К 24—48 ч регенерационного процесса в грануляционной ткани возрастает количество кровеносных сосудов (рис. 1, А). К этим же срокам относится размножение и увеличение числа клеток в области раны, в фибробластах и гистиоцитах отмечает-

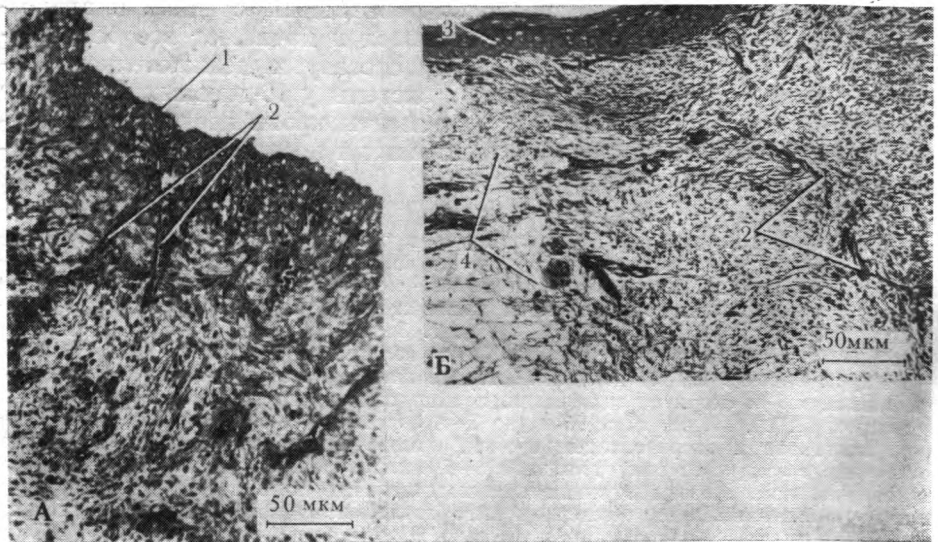


Рис. 1. Контроль. А — через 48 ч после операции, участок грануляционной ткани; Б — через 72 ч после операции, участок эпителизированной раны: 1 — поверхность раны, 2 — кровеносные сосуды, 3 — сомкнувшийся утолщенный эпидермис, 4 — границы грануляционной ткани; гематоксилин-эозин

ся высокая митотическая активность. Формирующаяся грануляционная ткань представлена большим количеством кровеносных сосудов, вытянутыми фибробластическими клетками, которые расположены плотно; чаще всего они ориентированы параллельно поверхности. К 72—96 ч после операции количество веретенновидных фибробластов еще более увеличивается, они густо оплетены коллагеновыми волокнами и располагаются параллельно поверхности. Границы грануляционной ткани с интактными районами обычно четкие (рис. 1, Б), а ее толщина в 2—2,5 раза превышает толщину интактной дермы.

Начиная с 48 ч после операции у эпителизированных концов раны можно выделить лежащий под эпидермисом слой грануляции (4—6 клеточных рядов), отличающийся плотностью и ориентацией клеток от подлежащих слоев; возможно, это заново образуется подэпителиальный слой дермы. В отличие от типичного подэпителиального слоя назовем его «подэпидермальным». К 3—4-м суткам заживления грануляционная ткань у части зародышей неоднородна, в ней, кроме подэпидермального, можно выделить 2—3 слоя, незначительно отличающихся друг от друга по плотности, цвету, клеточному составу. На типичные слои дермы похоже мало, но, возможно, это начальные стадии преобразования грануляции в нормальную кожу.

Заживление раны у подопытных животных

Эпидермис. Концы эпидермиса через 2—4 ч после операции в некрозе; нельзя отметить начало формирования эпителиальных языков: клетки не вакуолизируются, размер их нормальный. При введении иммунодепрессора в желточный мешок в эпидермисе на раневых краях через сутки некрозов не отмечается, языки сформированы; при введении циклофосфана в кровеносный сосуд через 24 ч после операции концы языков могут быть незначительно в некрозе, сами языки, как правило, плоские и не утолщенные. В обеих опытных подгруппах через сутки после нанесения надреза величина раны такая же, как и в контроле, но уменьшена митотическая активность в эпидермисе (количество митозов в прилежащих к ране и удаленных от нее районах эпидер-

миса по 0,4‰). В связи с этим, очевидно, наблюдается некоторое истончение удаленных от раны районов эпидермиса, поскольку по мере эпителизации не успевает восстанавливаться нормальное количество клеток. Близкая к нормальной пролиферативная активность восстанавливается ко 2-м суткам заживления (прилежащие районы — 2,9—3,0‰, удаленные — 0,8‰, в языках количество митозов превышает контрольные данные — 7,5‰); однако в опыте уже заметно отставание в эпителизации. При введении циклофосфана в кровеносный сосуд оно выражено больше.

Обычно передние концы регенерирующего эпидермиса лежат на поверхности раны, однако в некоторых случаях они погружаются в толщу подлежащей дермы (рис. 2, А). Иногда у подопытных зародышей наблюдаются картины, свидетельствующие о том, что после соприкосновения противоположных языков (с завершением эпителизации) их продвижение останавливается не сразу, они как бы продолжают расти навстречу друг другу еще некоторое время. В результате этого место смыкания выглядит уродливым, сильно складчатым.

Через 72 ч после операции эпидермис еще не покрыл всю поверхность раны, расстояние между противоположными языками составляло в среднем 5—10 клеточных диаметров (0,1 мм). При введении иммунодепрессора в кровеносный сосуд все зародыши в этот срок имели неэпителизованную поверхность раны (рис. 2, Б), при введении его в желточный мешок один из зародышей имел полностью эпителизованную поверхность (остальные 3 — неэпителизованную), но сомкнувшийся и утолщенный эпидермис был в 1,5—2 раза тоньше, чем в контроле. Во все сроки фиксации языки эпидермиса часто имели рваные края, они были тоньше и короче, чем в контроле.

Соединительная ткань. Во все сроки наблюдений уменьшается количество всех типов лейкоцитов в раневой дерме. Чаше всего гранулоциты и агранулоциты единичны, они очень диффузно и рыхло инфильтрируют соединительную ткань раны. Лейкоцитарный вал обычно отсутствует. Лейкоциты отмечаются редко, агранулоцитов крайне мало, сосуды заполнены лишь эритроцитами.

По мере заживления раны формирующаяся грануляционная ткань (коллагеновые волокна и фибробласты) приобретает ориентацию, параллельную поверхности, примерно на сутки позднее, чем в контроле; в первые 48 ч заживления раневая дерма хаотическая, беспорядочная

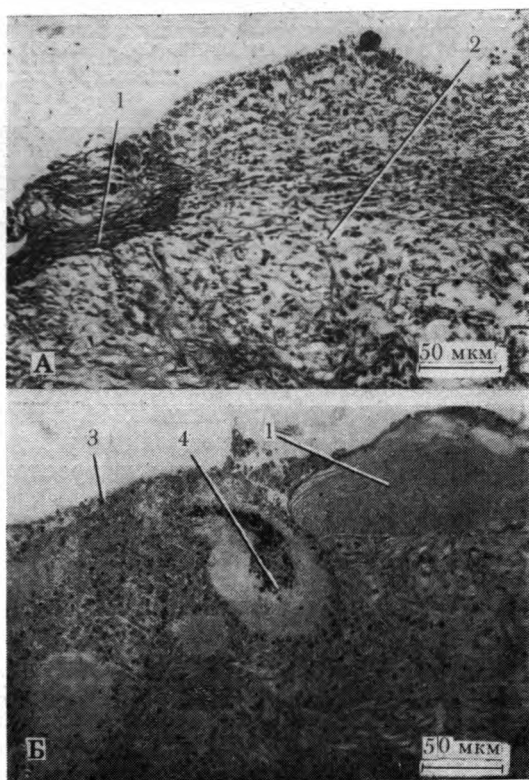


Рис. 2. Опыт, введение циклофосфана в кровеносный сосуд. А — через 48 ч после операции; Б — через 72 ч после операции, неэпителизованный участок раны:

1 — язык нарастающего эпидермиса, погружающийся в подлежащую соединительную ткань, 2 — рыхлая грануляционная ткань, 3 — неэпителизованная поверхность раны, 4 — очаги некрозов в грануляционной ткани; гематоксилин-эозин

(см. рис. 2, А). Некротическая зона на поверхности раны в опыте шире в 2—2,5 раза, чем в контроле, поверхностные слои дермы часто содержат некротизированные клетки, иногда встречаются очаги некрозов (см. рис. 2, Б).

Первые признаки формирования кровеносных сосудов наблюдаются лишь ко 2-м суткам. Близкое к нормальному количество кровеносных сосудов восстанавливается только к 3—4-м суткам.

К моменту завершения эпителизации толщина грануляционной ткани в опыте меньше, чем в контроле, в 1,5—2 раза (0,6—0,7 мм в контроле, 0,3—0,5 мм в опыте). Ее границы при введении циклофосфана в желточный мешок были более или менее четкими, при введении в кровеносный сосуд — размытыми, неясными. В обеих опытных подгруппах за все время наблюдений плотность соединительнотканной части раны была понижена. Первые митотические выделения фибробластов или гистиоцитов отмечены лишь к 44 ч после операции. Выделение подэпидермального слоя в грануляции у подопытных животных начинается примерно на сутки позднее и прослеживается менее четко, чем в контроле.

Заключение

Таким образом, циклофосфан, введенный 16-дневным эмбрионам кур в дозе 30 мг/кг, вызывает определенные изменения в ходе заживления линейной полнослойной кожной раны. Эти изменения к 4-м суткам после операции в некоторой степени сглаживаются, однако полноценного строения «типичного» восстановленного участка кожи не наблюдается.

Задержка в эпителизации раны, возможно, связана не только с тем, что в эпидермисе снижается митотическая активность, а языки его часто неправильной формы; по-видимому, в опыте толщина грануляционной ткани и ее плотность уменьшены. По мнению Биллингхэма и Руссэла [8], механизм сокращения ран связан с грануляционной тканью. Этими авторами было показано, что кортизон задерживает развитие грануляционной ткани, вследствие чего резко тормозится процесс сокращения ран. Установлено [10, 11], что фибробласты обладают сократительными свойствами, а сила сокращения полнослойных ран пропорциональна толщине грануляции и зависит от поведения фибробластов. Возможно, что циклофосфан влияет на заживление так же, как кортизон.

Важное значение имеет уменьшение числа лейкоцитов в толще ткани раны. Следствием этого может быть снижение их влияния на делящиеся клетки, изменение количества гистиоцитов, дифференцировавшихся из клеток лейкоцитарного ряда, нарушение неспецифической реакции лейкоцитов [2].

Литература

1. Бабаева А. Г. Иммунологические механизмы регуляции восстановительных процессов. М.: Медицина, 1972.
2. Балахонов А. В. Восстановительные процессы у животных и явления иммунитета. — Усп. соврем. биологии, 1978, т. 85, № 3, с. 423.
3. Балахонов А. В. Репаративная регенерация кожи эмбрионов кур 16-го дня инкубации. — Вестн. ЛГУ, 1979, № 3, с. 14.
4. Рольник В. В. Биология эмбрионального развития птиц. Л.: Наука, 1968.
5. Токин Б. П. Общая эмбриология. М.: Высшая школа, 1977.
6. Хлыстова З. С. К вопросу о развитии и строении кожи и ее производных у птиц. — Уч. зап. Оренбургск. отделения Всес. науч. об-ва анатомов, гистологов и эмбриологов, 1959, т. 2, с. 87.
7. Хрущов Г. К. Роль лейкоцитов крови в восстановительных процессах в тканях. М.: Изд-во АН СССР, 1945.
8. Billingham R., Russel R. Studies on wound healing with special reference to the phenomenon of contracture in experimental wounds in rabbits skin. — Ann. Surg., 1956, v. 144, p. 961.

9. Cohen S., Gabelnick H. et al. Effect of cyclophosphamide and adriamycin of surgical wounds in mice. — *Cancer*, 1975, v. 36, p. 1277.
10. Gabbiani G., Ryan G., Majno G. Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound contraction. — *Experientia*, 1971, v. 27, p. 549.
11. Highton D., James D. The role of contraction of fullthickness wounds of rabbit skin. — *Brit. Journ. Surg.*, 1964, v. 51, p. 462.
12. Mann M., Bedna B., Feit J. Effects of cyclophosphamide on the course of cutaneous wound healing. — *Neoplasma*, 1977, v. 24, № 5, p. 487.

Рекомендована кафедрой эмбриологии Ленинградского государственного университета им. А. А. Жданова. Поступила 8 февраля 1980 г.

УДК 591.481.8:591.181

НЕСПЕЦИФИЧЕСКОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ ЭКЗОГЕННОГО АЦЕТИЛХОЛИНА НА ЭЛЕКТРИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ НЕЙРОНОВ ВИНОГРАДНОЙ УЛИТКИ

Т. Н. Греченко, Р. Мартинес-Солер, Е. Д. Шехтер

Длительные микроапликации ацетилхолина к поверхности соматической мембраны нейронов висцерального комплекса ганглиев виноградной улитки приводят к изменениям электрогенеза потенциалов действия (ПД). Это проявляется в постепенном снижении амплитуды ПД вплоть до полного подавления их генерации, в дроблении ПД на микрокомпоненты, в возрастании амплитуды ПД. Влияние больших количеств ацетилхолина на процессы электрогенеза ПД обнаружено как у нейронов, не имеющих специальной чувствительности к медиатору, так и у нейронов, отвечающих возбуждением или торможением на его действие в малых количествах. Предполагается, что ацетилхолин влияет на процессы электрогенеза потенциалов действия.

Согласно существующим представлениям, следствием взаимодействия ацетилхолина с холинорецепторами хемочувствительной мембраны является изменение ее проницаемости для ионов определенного вида, что приводит к развитию деполяризационного или гиперполяризационного смещения мембранного потенциала (МП) нейрона [4—6, 9]. В исследованиях с использованием микроапликаций ацетилхолина на соматическую мембрану нейронов были найдены клетки, отвечающие на действие ацетилхолина возбуждением (Д-нейроны) и торможением (Н-нейроны) [9]. Немного позднее было установлено [7], что ответ нейрона зависит от места апликации ацетилхолина на сому: одни участки хемовозбудимой мембраны могут отвечать на действие медиатора возбуждением, другие — торможением, третьи — двухфазной реакцией, состоящей из возбудительной и тормозной фаз.

Мы исследовали действие ацетилхолина на электрическую активность нейронов виноградной улитки.

Методика

Для проведения экспериментов висцеральный комплекс ганглиев с правым и левым паллиальными нервами и иннервируемыми ими участками мантии иссекали из тела моллюска и закрепляли на парафиновом столике препаративными иглами. Препарат помещали в физиологический раствор следующего состава: NaCl — 6,45 г, KCl — 0,12 г, CaCl₂ — 0,14 г, MgCl₂ — 0,2 г на 1 л дистиллированной воды.

Для внутриклеточной регистрации электрической активности нейронов, нанесения электрических внутриклеточных раздражений и микроапликаций ацетилхолина пользовались стеклянными микроэлектродами, изготовленными из стекла марки «Пирекс». Спротивление микроэлектродов, заполненных 2,5 М хлористым калием, в физиологическом растворе составляло 30—50 МОм. Микроэлектроды для микроионофореза ацетилхолина заполняли раствором ацетилхолингидрохлорида рН 4,0.