

І.В.Ташук, Р.В.Сенютович

ВПЛИВ ПОСТІЙНОЇ ТЕМРЯВИ НА АКТИВНІСТЬ РЕЗИДУАЛЬНИХ МАКРОФАГІВ У МИШЕЙ З АДЕНОКАРЦИНОМОЮ ГРУДНОЇ ЗАЛОЗИ

Кафедра онкології, променевої діагностики та променевої терапії (зав. – проф. Р.В.Сенютович)
Буковинського державного медичного університету, м. Чернівці

Резюме. Вивчено активність перитонеальних макрофагів у мишей з перещепленою аденокарциномою грудної залози Ca755, які утримувалися за різних світлових режимів. Встановлено, що за умов постійної темряви збільшення активності резидуальних макрофагів

супроводжується підвищенням рівня Т-лімфоцитів у лімфовузлах, що свідчить про інтенсифікацію процесів кооперації імункомпетентних клітин.

Ключові слова: аденокарцинома, темрява, макрофаги, лімфоцити, мелатонін.

Вступ. Центральне місце в хронобіологічній організації, регулюванні циркадних ритмів та в процесі адаптації організму до змін зовнішнього середовища належить шишкоподібному тілу [5]. Фотоперіодична інформація надходить до центральної нервової системи через фоторецептори сітківки та надалі – до епіфіза мозку. Показано, що синтез мелатоніну, основного індоламіну епіфіза мозку, відбувається тільки за умови темряви і гальмується у світлу фазу доби [4]. Поряд із підвищенням рівня плазматичного та епіфізарного мелатоніну, у період темряви [8,9,12] відмічаються й інші ознаки активності залози: зростання частоти електричних розрядів пінеалоцитів, збільшення об'єму мітохондрій, ендоплазматичного ретикулула та апарату Гольджі [1]. Епіфіз здійснює антистресовий захист мозку та інших органів шляхом утворення мелатоніну та гормонів пептидної природи (епіталамін), які мають нейропротекторні, імуностимулювальні та онкостатичні властивості [10].

Мета роботи. Дослідити активність резидуальних макрофагів та визначити кількість тканинного пулу лімфоцитів у мишей із щепленою аденокарциномою грудної залози Ca755 за умов постійної темряви та природного фотоперіоду.

Матеріал і методи. Дослідження виконані на мишах-самках лінії C57Bl із щепленою аденокарциномою грудної залози Ca755 (маса тіла - 0,02 кг, розведення віварію ІЕПОР НАНУ ім. Р.Е.Кавецького). Вивчення показників імунної системи проведено на 14-ту добу після щеплення.

Мишей розподілено на дві дослідні групи, по п'ять тварин у кожній. Миші першої групи знаходилися в умовах природного фотоперіоду, другої - за умов постійної темряви. На 14-ту добу експерименту тварин забивали під ефірним наркозом методом декапітації та проводили забір тканин тимуса, селезінки та лімфовузлів (пахвинних - 4, пахових - 2, підколінних - 2, всього - 8). На торсійних терезах визначали абсолютну масу органів та розраховували показник відносної маси кожного з них (у% від маси тіла).

Органи розтирали в гомогенізаторі Поттера в живильному середовищі 199, яке містило 10% сироватку крові великої рогатої худоби. Клітини центрифугували при 1,5 тис. об/хв протягом 10 хв. Суспензію клітин, виділених із селезінки,

додатково обробляли 0,83% розчином NH_4Cl для лізису еритроцитів упродовж 6 хв, після чого тричі відмивали від NH_4Cl у середовищі 199 (1,5 тис. об/хв, 10 хв). Підрахунок кількості життєздатних лімфоцитів, вилучених із кожного органа, проводили за стандартною методикою, використовуючи суправітальне фарбування трипановим синім. Розраховували вміст клітин на 1 мг маси органа та відсоток життєздатних клітин.

Визначали субпопуляційний склад суспензій клітин із лімфатичних вузлів. Препарати для цитологічного дослідження готували із суспензій, які містили по $4\text{-}5 \cdot 10^6$ клітин/мл, за методом висушених краплин та фарбували за методом Штокінгера-Кельнера 1% розчином метиленового синього з подальшим диференціюванням у цитратному буфері Зеренсена (рН 4.96). Проводили мікроскопію 1000 клітин, підраховуючи Т- (макро-) та В- (мікронуклеолярні) лімфоцити, лімфобласти і великі лімфоцити, а також інші клітинні елементи [7].

Активність макрофагів визначали в НСТ-тесті. Останні вимивали на 14-ту добу з черевної порожнини за стандартним методом [11]. Готували суспензії клітин (4×10^6 в мл) у живильному середовищі 199, яке містило 10% сироватку крові великої рогатої худоби, змішували рівні об'єми (по 0,1 мл) таких суспензій і розчину нітросинього тетразолію ("Сетарол", Чехія), інкубували проби 40 хв при 37°C та 20 хв при $20\text{-}21^\circ\text{C}$, клітини концентрували центрифугуванням. З осаду готували мазки, які фарбували за методом Романовського. У кожному мазку підраховували 100 макрофагів, диференціюючи їх на такі групи: 0 – клітини без гранул диформагану; 1 – 5-7 гранул у цитоплазмі; 2, 3 – гранули займали менше 30 - 50% цитоплазми відповідно; 4 – цитоплазма заповнена гранулами на 50-100%, ядро контуроване; 5 – ядро не контурується (100% заповненість гранулами). Цитохімічний показник активності (ЦПА) розраховували за формулою:

$$\frac{\sum_{a,v} a \cdot v}{100}$$

де a – порядковий номер групи, v – кількість клітин у цій групі [2].

Для порівняння результатів, отриманих у тварин дослідної і контрольної груп, використовували індекси модуляції [6].

Таблиця 1

Показники абсолютної та відносної маси імунокомпетентних органів у тварин з аденокарциномною грудної залози ($x \pm Sx$)

Група	Тимус		Селезінка		Лімфовузли	
	мг	%	мг	%	мг	%
Природний фотоперіод, n=5	50,0±3,0	2,5±0,1	244,0±11,1	12,2±0,5	76,0±9,0	3,8±0,4
Постійна темрява, n=5	37,3±13,8	2,0±0,7	243,3±45,9	12,6±1,8	53,3±1,8 p<0,05	2,8±0,1 p<0,05

Примітки. p - ступінь вірогідності різниць показників у досліджуваних тварин; n - число спостережень

Таблиця 2

Показники загальної клітинності та клітинності на 1 мг маси імунокомпетентних органів ($x \pm Sx$)

Група	Тимус		Селезінка		Лімфовузли	
	абс.	на 1 мг маси	абс.	на 1 мг маси	абс.	на 1 мг маси
Природний фотоперіод, n=5	100,7±12,0	2,0±0,2	232,7±16,6	0,9±0,03	83,7±10,7	1,1±0,03
Постійна темрява, n=5	69,3±31,1	1,6±0,4	210,3±36,2	0,86±0,03	62,7±8,9	1,2±0,2

Примітка. n - число спостережень

Таблиця 3

Субпопуляційний склад лімфовузлів мишей лінії C₅₇Bl ($x \pm Sx$)

Група тварин	Відносний вміст, %:			
	T-лімфоцитів	B-лімфоцитів	Лімфобластів та великих лімфоцитів	Інші клітинні елементи
Природний фотоперіод, n=5	67,2±0,61	30,1±0,52	2,2±0,12	0,50±0,13
Постійна темрява, n=5	69,9±0,84 p<0,05	28,1±0,85	1,6±0,27	0,40±0,06

Примітка. P - ступінь вірогідності різниць показників у досліджуваних тварин; n - число спостережень

Таблиця 4

Кількість та показники активності макрофагів (в НСТ-тесті) мишей лінії C₅₇Bl ($x \pm Sx$)

Група	Кількість макрофагів, $\times 10^6$	Цитохімічний показник активності
Природний фотоперіод, n=5	5,5±0,6	8,0±0,6
Постійна темрява, n=5	5,2±0,9	14,0±0,2 p<0,05

Примітка. P - ступінь вірогідності різниць показників у досліджуваних тварин; n - число спостережень

Математичну обробку результатів проводили з використанням t-критерію Стьюдента на PC Pentium II за програмою "Biostat" [3].

Результати дослідження та їх обговорення.

Встановлено, що за умов постійної темряви показники абсолютної та відносної маси тимуса і селезінки вірогідних змін не зазнавали, тоді як абсолютна та відносна маса лімфовузлів зменшувалася (табл. 1).

Загальна та відносна клітинність тимуса, селезінки і лімфовузлів вірогідно не змінювалася (табл. 2).

У групі мишей, що знаходилися за умов постійної темряви, спостерігалася підвищення вмісту T-лімфоцитів у лімфовузлах (табл. 3). Вміст B-лімфоцитів, лімфобластів і великих лімфоцитів та інших клітинних елементів вірогідних змін не зазнавав.

Як видно з табл. 4, кількість макрофагів у мишей, які знаходилися за умов постійної темря-

ви, відповідала такій у тварин, що утримувалися в умовах природного фотоперіоду. Водночас цитохімічний показник активності макрофагів вірогідно вищий.

Це свідчить про активацію резидуальних макрофагів, які виконують антигенпрезентувальну функцію. Одночасне підвищення кількості T-лімфоцитів у периферичних лімфовузлах (тобто T-лімфоцитів, які активовані та беруть участь в імунній відповіді) вказує на інтенсифікацію процесів кооперації клітин в імунній відповіді. На нашу думку, фактором, що призводить до вищезазначених змін, може бути гормон шишкоподібного тіла – мелатонін, рівень у крові якого за умов постійної темряви, як відомо, зростає в десятки разів [4], а сам мелатонін виявляє онкостатичні та імуномодулювальні властивості [10].

Висновок

Утримання мишей лінії C₅₇Bl із підшкірно перещепленою аденокарциномною грудної залози

Ca755 в умовах постійної темряви призводить до підвищення активності резидуальних макрофагів та збільшує кількість Т-лімфоцитів у периферичних лімфатичних вузлах.

Література

1. Анисимов В.Н. Физиологические функции эпифиза (геронтологический аспект) // Рос. физиол. ж. им. И.М.Сеченова – 1997. - Т. 83, №8. - С. 1-13.
2. Войткевич В.А. Определение общей окислительно-восстановительной активности нейтрофилов с помощью гистохимического красителя нитросинего тетразолия // Лаб. дело. – 1977. – №3. – С. 147-148.
3. Гланц С. Медико-биологическая статистика. – М: Практика, 1999. – 459 с.
4. Мешишен І.Ф., Пішак В.П., Заморський І.І. Мелатонін: обмін та механізм дії // Бук. мед. вісник. - 2001. - Т. 5, №2. - С. 3-15.
5. Пишак В.П. Клиническая анатомия шишковидного тела (эпифиза).- Черновцы, 1992.- 101 с.
6. Савцова З.Д., Ковбасюк С.А., Юдина О.Ю. и др. Морфофункциональные показатели некоторых иммунокомпетентных органов мышей // Радиобиология. – 1991. – Т. 31, Вып. 5. – С. 679-686.
7. Уманский Ю.А., Глузман Д.Ф., Юдин В.М. и др. Цитологическая идентификация Т- и В-лимфоцитов мышей // Докл. АН СССР. – 1975. – Т.221, №5. – С. 1193-1195.
8. Cassone V.M. Melatonin: Time in a bottle // Oxford Rev. Reprod. Biol. - 1990. - Vol. 12. - P. 319-367.
9. Lemaigre-Voreaux P. Melatonine et lumiere // LUX. - 1986. - № 139. - P. 183-197.
10. Panzer A., Viljoen M. The validity of melatonin as an oncostatic agent // J.Pineal Res. – 1997. – Vol.22, №4. – P.184-202.
11. Pereira J., Watanabe S., Bruera E. Infections in a palliative care unit // Suppor. Care Canc. – 1997. – Vol. 5, №2. – P. 153.
12. Slama-Scemama A., Noteborn H. P. J. M., de Moree A. et al. The effect of ovine pineal compounds prepared under red or green light on the activity of male rat anterior pituitaries in vitro // J. Neural Transmiss.- 1985.- Vol. 62, № 1-2.- P. 155-167.

INFLUENCE OF PERMANENT DARKNESS ON THE ACTIVITY OF RESIDUAL MACROPHAGES IN MICE WITH MAMMARY ADENOCARCINOMA

I.V.Tashchuk, R.V.Seniutovych

Abstract. The author has investigated the activity of peritoneal macrophages of mice, with inoculated mammary adenocarcinoma Ca755, which were kept under different light conditions. It has been established, that under conditions of permanent darkness, an increase of the activity of residual macrophages is accompanied by an increased level of T-lymphocytes in the lymph nodes, suggesting an intensification of the processes of cooperation of immunocompetent cells.

Key words: adenocarcinoma, darkness, macrophages, lymphocytes, melatonin.

Bukovinian State Medical University (Chernivtsi)
Buk. Med. Herald. – 2006. – Vol.10, №4.- P.176-178

Надійшла до редакції 12.06.2006 року