

УДК 616—006—092.9:611.814.1

В. Б. Винницкий, И. Н. Шевченко, В. А. Хмара

**РАДИОАВТОГРАФИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СИНТЕЗА
ДНК В КЛЕТКАХ ЛИМФАТИЧЕСКИХ ОРГАНОВ КРЫС
С ДМБА-ИНДУЦИРОВАННЫМ КАНЦЕРОГЕНЕЗОМ
ПРИ ЭЛЕКТРОСТИМУЛЯЦИИ ЗАДНЕГО ГИПОТАЛАМУСА**

Развитие химически индуцированного канцерогенеза сопровождается фазовым изменением интенсивности синтеза ДНК в ядрах лимфоцитов — повышением этого показателя в период образования опухолевых зачатков и угнетением синтетических процессов в клетках лимфатических органов на этапе прогрессивного развития опухоли [5, 11].

Ранее нами было установлено, что электростимуляция области задних ядер гипоталамуса значительно тормозит развитие химического канцерогенеза у крыс [3, 4]. Можно предположить, что этот эффект в значительной мере обусловлен повышением иммунологической реактивности организма, так как известно, что задняя область гипоталамуса связана с регуляцией деятельности симпатно-адреналовой системы и коры надпочечников, нейромедиаторы и гормоны которых, оказывая влияние на пролиферацию и специфические функции иммунокомпетентных клеток, могут модулировать интенсивность иммунных реакций [8, 12]. В литературе нет данных о синтетических и пролиферативных процессах в лимфоидных органах при воздействии на гипоталамус.

Учитывая ведущую роль иммунокомпетентных клеток в формировании противоопухолевых реакций, мы поставили задачу изучить влияние электростимуляции области задних гипоталамических ядер на радиоавтографические показатели пролиферативной активности клеток селезенки и лимфатических узлов и развитие ДМБА-индуцированного канцерогенеза у крыс.

Методика исследований

Опыты проведены на 140 крысах-самцах породы Вистар весом 220—250 г в возрасте 2 мес по следующей схеме: 25 животным ввели внутримышечно 0,2 мл абрикосового масла (контроль); 115 крысам вводили 9,10-диаметил-1,2-бензотрацен (ДМБА) в мышцу бедра левой лапки в дозе 3 мг в 0,2 мл абрикосового масла; через 3 мес после введения канцерогена 48 крысам были вживлены электроды в область задних гипоталамических ядер. Первый электрод ориентировали в плоскости $AP-(+2)$, второй — в плоскости $AP-(+4)$. Электроды располагали на 0,3 мм латеральнее средней линии слева и погружали в мозг на 8 мм. Координаты электродов определяли по стереотаксическому атласу Фифковой и Маршалла. Электростимуляцию гипоталамуса проводили током пороговой силы (индивидуальную величину тока определяли по поведенческим реакциям животных) прямоугольными импульсами переменной полярности длительностью 1 мс, напряжением 1—2 В, частотой 80 имп/с ежедневно по 5 мин и начинали ее не ранее чем через 7 сут после операции. Всего проведено 25 сеансов электростимуляции. Методика вживления электродов и определения их локализации в мозге описана нами ранее [3].

После 10 сеансов электростимуляции группе животных (10 крыс) внутрибрюшинно вводили 3H -тимидин (11,8 мКи/мл, 1 мКи/г). Одновременно изотоп вводили шести

крысам с ДМБА-индуцированным канцерогенезом, которых не подвергали электростимуляции и шести контрольным животным. Через 1 ч после введения радиоактивной метки животных декапитировали и брали для исследования селезенку и регионарные (левые паховые) и отдаленные (правые паховые), по отношению к месту введения канцерогена, лимфоузлы.

Ткани фиксировали в жидкости Карнуа, часть препаратов — в 10% нейтральном формалине. Гистологическую обработку тканей проводили обычным способом: проводка по спиртам, заливка в парафин, приготовление срезов толщиной 4—5 мкм. Препараты депарафинировали, покрывали мелкозернистой эмульсией для ядерных исследований типа «М» и экспонировали две недели, затем проявляли в амидоловом проявителе, закрепляли, окрашивали гематоксилин-эозином или азури-эозином (по Романовскому), заключали в бальзам. Полученные таким образом радиоавтоматические микрофотографии и определяли индекс метки: выраженное в процентах количество меченых клеток, входящих в число 1000 исследованных клеток. Как правило исследовали по 4—5 тыс клеток в каждом препарате. Помимо подсчета среднего значения индекса метки в препаратах особое внимание уделяли значительным скоплениям меченых клеток (реактивных центров) в лимфоузлах и селезенке [2, 6, 9].

Результаты исследований и их обсуждение

По данным радиоавтоматической, индекс метки в лимфоидных органах животных, которым вводили ДМБА и подвергали электростимуляции гипоталамуса, был во всех случаях достоверно выше, чем у крыс, подвергавшихся воздействию ДМБА без электростимуляции, и у контрольных животных. При сравнении интенсивности синтеза ДНК в лимфатических узлах и селезенке крыс, получавших только канцероген, и животных контрольной группы достоверных различий не выявлено. Можно отметить тенденцию к уменьшению этого показателя в селезенке у нестимулированных крыс с ДМБА-индуцированным канцерогенезом (см. таблицу).

Исследование гистологических препаратов позволило установить, что лимфатические узлы контрольных животных имеют четко различимые структуры, свойственные этому органу: капсулу, краевую зону, синусы, располагающиеся в кортикальной и медуллярной зонах, фолликулы. Немногочисленные реактивные центры фолликулов рассеяны

Включение ^3H -тимидина в ДНК ядер лимфоцитов лимфатических органов крыс с ДМБА-индуцированным канцерогенезом при электростимуляции гипоталамуса

Группа животных (воздействие)	Индекс мечения (%) в лимфатических органах, $M \pm m$			Количество животных с опухолями в группах
	Регионарные лимфоузлы	Отдаленные лимфоузлы	Селезенка	
I ДМБА+электростимуляция гипоталамуса	$3,1 \pm 0,17$	$1,18 \pm 0,14$	$2,78 \pm 0,7$	Всего животных—38 Животных с опухолями—10 Выход опухолей в %— $26,4 \pm 7,1$ ($p < 0,001$)
II ДМБА	$0,8 \pm 0,11$	$0,5 \pm 0,11$	$0,6 \pm 0,1$	Всего животных—61 Животных с опухолями—38 Выход опухолей в %— $61,7 \pm 6,2$
III Контроль (абрикосовое масло)	$0,7 \pm 0,15$	$0,32 \pm 0,1$	$0,8 \pm 0,12$	—

*—достоверность различий между I и II, I и III группами;

**—достоверность различий между II и III группами.

в паракортикальной зоне. Отмечено небольшое количество лимфоидных и ретикулярных клеток, содержащих радиоактивную метку. Эти клетки располагаются, главным образом, в корковой зоне лимфоузлов. Как правило, в меченых клетках содержится не более 10—15 зерен ^3H -тимидина. В некоторых участках обнаруживаются скопления (20—30) меченых лимфоидных клеток.

Структура лимфатических узлов крыс, получавших ДМБА, в основном сохранена. Отмечается огрубление капсулы и трабекул. Выражена реакция со стороны корковых и медуллярных синусов — их расширение. Наблюдается разрастание волокнистой ткани, очаговый фиброз и гиалиноз. Под капсулой узла имеются участки некроза с замещением фиброзной тканью. Лимфоидная реакция не выражена, наблюдается уменьшение количества лимфоидной ткани. Лимфоциты и их ядра имеют нечеткие и неправильные контуры, выражены анизокариоз и фрагментация ядер, распад клеточных элементов. В участках, где лимфоидная ткань сохранена, имеются диффузно расположенные клетки, содержащие радиоактивную метку. Гораздо реже, чем в норме обнаруживаются скопления меченых лимфоцитов (до 10 клеток).

Лимфатические узлы животных, которым вводили ДМБА и подвергали электростимуляции гипоталамуса, характеризуются несколько сглаженным рисунком: нечетко контурируются фолликулы, капсула разрыхлена. Сохранен подкорковый синус, мозговые синусы не видны. Отмечается гомогенизация узла с выраженной лимфоидной пролиферативной реакцией. Привлекает внимание обилие меченых лимфоцитов, содержащих, как правило, более 20 зерен ^3H -тимидина и располагающихся как в кортикальной, так и в медуллярной зонах. Выражена сосудистая реакция — расширение кровеносных сосудов узла.

Аналогичные изменения структуры и пролиферативной активности клеток отмечены в селезенках животных подопытных групп. У крыс, которым вводили только ДМБА, отмечены дегенеративные изменения клеток, некоторое уменьшение количества меченых клеточных элементов по сравнению с интактными животными. В селезенке животных, которых после введения канцерогена стимулировали, наблюдалось достоверное увеличение количества реактивных центров и клеток, интенсивно включающих ^3H -тимидин.

Микрофотографии лимфатических узлов и селезенки представлены на рис. 1 и 2.

Проведенные радиоавтографические и морфологические исследования позволили установить, что электростимуляция области задних гипоталамических ядер, которую проводили в период, непосредственно предшествующий образованию опухолевых очагов, вызвала значительное повышение синтеза ДНК в ядрах лимфоцитов лимфатических узлов, особенно в регионарных к месту введения канцерогена, и в селезенке. Есть основания полагать, что это увеличение синтетической активности лимфоидных элементов сопровождалось повышением их специфических защитных функций, так как количество крыс с развившейся опухолью в группе стимулированных животных было значительно меньше, чем в группе нестимулированных крыс. Учет количества животных с опухолями был проведен через 5 мес после введения канцерогена.

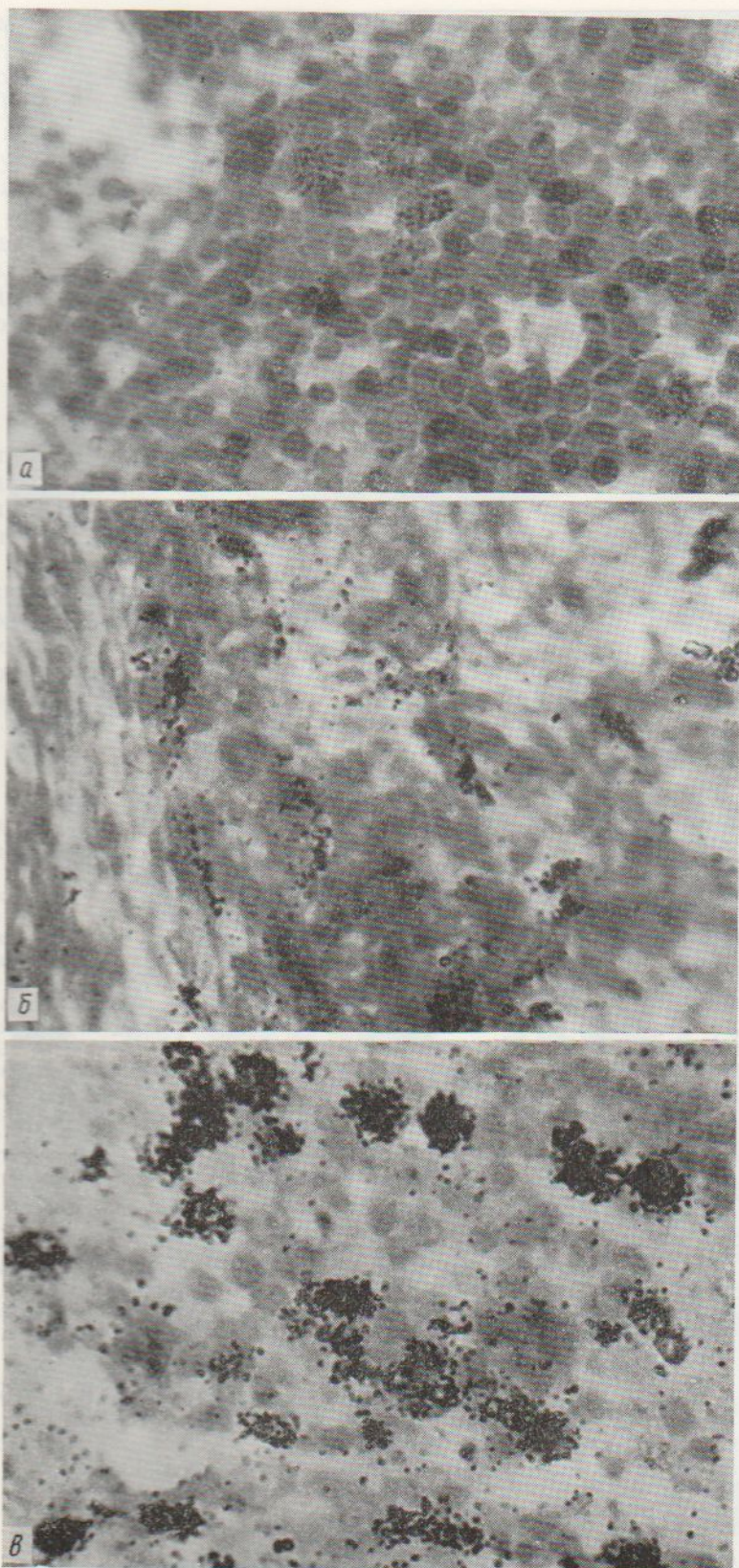
Ранее нами было показано, что электростимуляция заднего отдела гипоталамуса сопровождается активацией тонуса симпатно-адреналовой системы и повышением концентрации свободного кортикостерона в плазме крови [1, 4]. По-видимому, такие нейро-гуморальные сдвиги являются оптимальными для формирования иммунного ответа. Пока-

зано, напри-
малую ак-
пределах у-
реакций (10
Можно
электростим-
чески повы-
лужеродные
ках под воз-
чительно бо-
тивных про-
ми реагирова-

1. Зас-
вызывает не-
ДМБА между
попытки
ски уа-
2. По-
возможности
личены пр-
состояние и
хлудирова-

1. Близко-
Механизм
2. Анализ
1980-85
2. Анализ
тестовым
эксперим-
тестовым
гипотезы
1980-85
2. Анализ
тестовым
эксперим-
тестовым

Рис. 1. Радиоавтограмма регионарных паховых лимфатических узлов крыс через 3,5 мес после введения а — абрикосового масла (контроль), б — ДМБА, в — ДМБА и электростимуляции гипоталамуса. Окраска гематоксилин-эозином. Увеличение 10×90 .



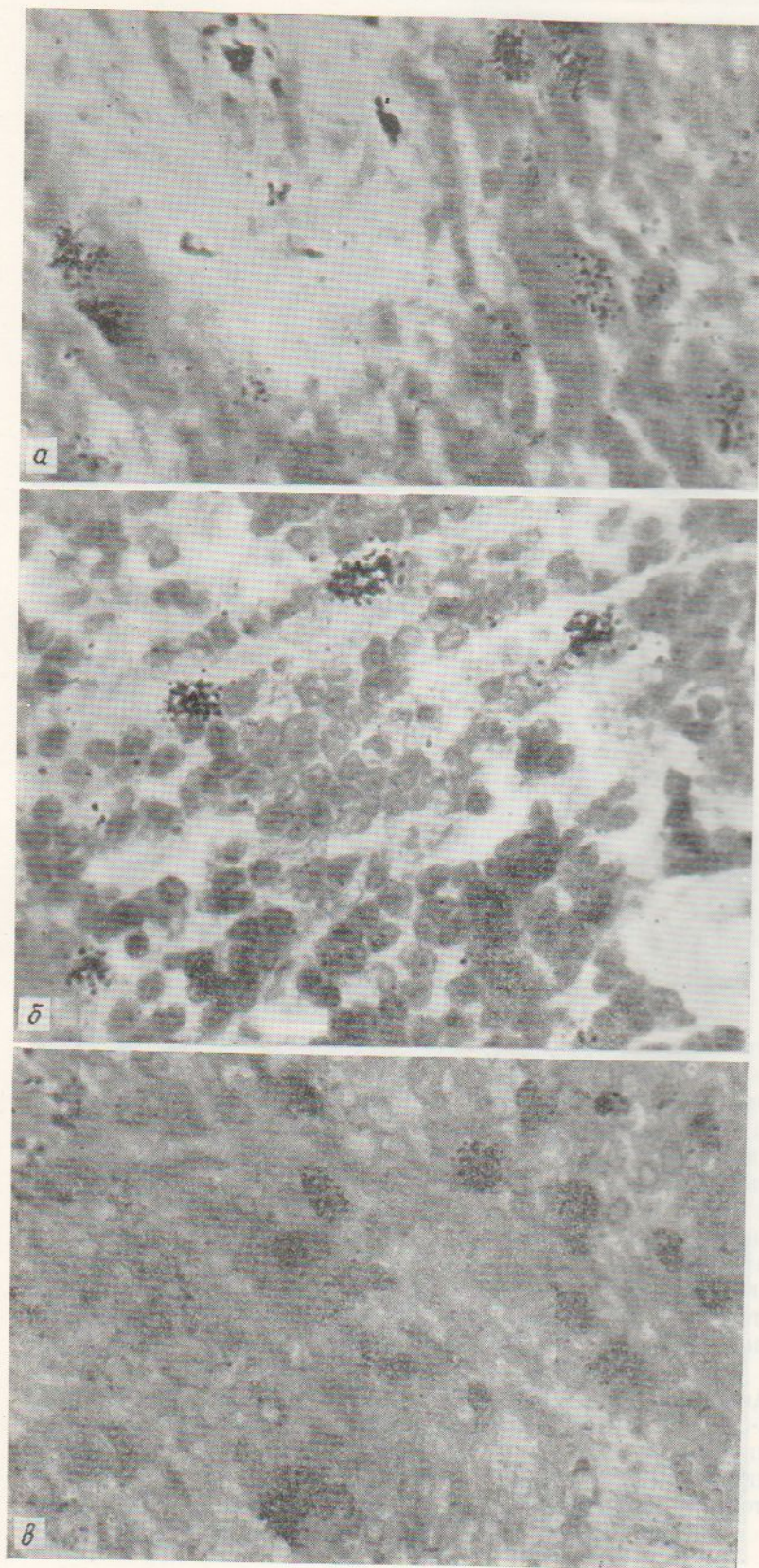


Рис. 2. Радиоавтограмма селезенки крыс через 3,5 мес после введения а — абрикосового масла (контроль), б — ДМБА, в — ДМБА и электростимуляции гипоталамуса. Окраска гематоксилин-эозином. Увеличение 10×90 .

зано, например, что некоторые нейромедиаторы повышают функциональную активность лимфоцитов [7], а повышение в физиологических пределах уровня кортикостерона способствует развитию иммунных реакций [10].

Можно полагать, что нейро-гуморальные перестройки, вызванные электростимуляцией области задних ядер гипоталамуса, неспецифически повышают готовность иммунокомпетентных клеток к реакции на чужеродные антигены, в частности на антигены, появляющиеся в клетках под воздействием химических канцерогенов. Этим объясняется значительно более выраженная активация синтетических и пролиферативных процессов в регионарных лимфоузлах, клетки которых первыми реагируют на опухолевый антиген.

Выводы

1. Электростимуляция области задних гипоталамических ядер повышает индекс метки в лимфатических узлах и селезенке крыс с ДМБА-индуцированным канцерогенезом. Наиболее существенно это повышение в регионарных к месту введения канцерогена лимфатических узлах.
2. Повышение синтеза ДНК в клетках лимфоидных органов под воздействием электростимуляции гипоталамуса свидетельствует об увеличении пролиферативной активности лимфоцитов. Функциональное состояние их в значительной мере обуславливает торможение ДМБА-индуцированного канцерогенеза.

Литература

1. Балицкий К. П., Винницкий В. Б., Воронцова А. Л., Сопочинская Е. Б., Шуба Е. П. Механизмы противоопухолевой резистентности.— К.: Наукова думка, 1978.—208 с.
2. Вельш У., Шторх Ф. Введение в цитологию и гистологию животных.— М.: Мир, 1976.—248 с.
3. Винницкий В. Б., Шмалько Ю. П. Влияние электростимуляции области задних гипоталамических ядер на экскрецию катехоламинов с мочой и развитие ДМБА-индуцированных опухолей у крыс.— Физиол. журнал, 1978, 24, № 3, с. 401—406.
4. Винницкий В. Б., Придатко О. Е., Шмалько Ю. П., Балицкий К. П. Роль нейро-гуморальных факторов в формировании противоопухолевой резистентности.— В кн.: Теоретическая иммунология — практическому здравоохранению. Таллин, 1978, с. 177—178.
5. Гудим-Левкович К. А. Некоторые стороны обмена ДНК в иммунокомпетентных органах мышей в процессе канцерогенеза.— В кн.: Иммунология химического канцерогенеза. К.: Наукова думка, 1975, с. 104—123.
6. Епифанова О. И., Терских В. В., Захаров А. Ф. Радиоавтография.— М.: Высшая школа, 1977.—252 с.
7. Козлов В. К. Проблема регуляции функции специфического иммунитета.— В кн.: Проблемы современной иммунологии. М.: Медицина, 1972, с. 255—258.
8. Корнева Е. А., Клименко В. М., Шхинек Э. К. Нейро-гуморальное обеспечение иммунного гомеостаза.— Л.: Наука, 1978.—176 с.
9. Меркулов Г. А. Курс гистологической техники.— Л.: Медицина, 1969.—423 с.
10. Соркин Э., Пьерпаоли В. Гормоны и способность к иммунологическому ответу.— В кн.: Современные проблемы иммунологии и иммунопатологии. Л., 1970, с. 51—59.
11. Уманский Ю. А. Иммунологическая реактивность при раке.— К.: Здоров'я, 1974.—240 с.
12. Фролов Е. П. Нейро-гуморальные механизмы регуляции иммунологических процессов.— М. Медицина, 1974.—264 с.

Институт проблем онкологии им. Р. Е. Кавецкого
АН УССР

Поступила в редакцию
12.VII 1978 г.