

## РЕАКЦИЯ CD1A- И CD3-ПОЗИТИВНЫХ КЛЕТОК ТИМУСА ПРИ ВВЕДЕНИИ МЕЛАТОНИНА В РАЗЛИЧНЫХ СВЕТОВЫХ УСЛОВИЯХ

Шатских О.А.<sup>1</sup>, Лузикова Е.М.<sup>1</sup>, Сергеева В.Е.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБОУ ВПО «Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова», Чебоксары, Россия, e-mail: dum2dum@mail.ru

В работе с помощью иммуногистохимических методов исследованы количественные показатели CD1a- и CD3-позитивных клеток тимуса. Экспериментальным мышам в возрасте 2 месяцев вводился мелатонин (препарат Мелаксен, Unipharm, USA) перорально в дозе 4 мг/л с водой ежедневно в течение 2 и 4 недель в условиях обычного освещения и постоянного затемнения. Было установлено, что введение мелатонина независимо от длительности и световых условий содержания животных не вызывает статистически значимых изменений по количеству CD1a-позитивных клеток в корковом веществе долек тимуса. Однако в ходе эксперимента выявлено снижение количественных показателей CD3-позитивных клеток в корковом и мозговом веществе, на границе коркового и мозгового вещества долек тимуса мышей независимо от условий освещения. Причем наиболее выраженная реакция зрелых тимоцитов отмечается на 4-й неделе эксперимента.

Ключевые слова: тимус, мелатонин, CD1a, CD3

## THE REACTION OF CD1A- AND CD3-POSITIVE CELLS IN THE THYMUS ON THE INTRODUCTION OF MELATONIN IN DIFFERENT LIGHT CONDITIONS

Shatskikh O.A.<sup>1</sup>, Luzikova E.M.<sup>1</sup>, Sergeeva V.E.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Chuvash State University n. a. I. N. Ulyanov, Cheboksary, Russia, e-mail: dum2dum@mail.ru

In the work with the use of immunohistochemical methods were investigated quantitative indicators of CD1a- and CD3-positive cells in the thymus. Experimental mice aged 2 months were administered melatonin (drug Melaxen, Unipharm, USA) in oral dose of 4 mg/l of water per day for 2 and 4 weeks by daylight and artificial darkening. It was found that the administration of melatonin independently of the duration and lighting conditions of the animals does not cause statistically significant changes in the number of CD1a-positive cells in the cortex of the lobules of the thymus. However, during the experiment we detected the decrease of quantitative indicators of CD3-positive cells in the cortical and medullary substance, on the border of cortex and medulla of the lobules of the thymus independently of lighting conditions. The most severe reaction of mature thymocytes is observed at week 4 of the experiment.

Keywords: thymus, melatonin, CD1a, CD3

Мелатонин является универсальным регулятором биологических ритмов живых организмов, выступает посредником между пейсмейкерным механизмом супрахиазматических ядер гипоталамуса и периферическими органами [3]. У гормона выявлены разнообразные функции как иммуномодулятора [8], сильного антиоксиданта [6], онкопротектора [10], снотворного [5], адаптогена [1].

Известно, что содержание животных в условиях нарушенного светового режима оказывает значительное влияние на иммунный статус, что связано с изменением синтеза мелатонина в эпифизе [2]. Т-лимфоциты несут на себе рецепторы к мелатонину [9], ввиду чего активно реагируют на него. Для оценки состояния тимопоэза на ранних и поздних его стадиях в работе были использованы CD1a и CD3 маркеры.

**Целью** исследования является изучение количественной реакции CD1a- и CD3-позитивных клеток тимуса при введении мелатонина в различных световых условиях.

## **Материал и методы исследования**

Объектом гистологического исследования служил тимус 160 половозрелых белых мышей-самцов 2-месячного возраста. Животные были распределены на 8 групп: 1-я контрольная ( $n = 20$ ) – животные, которые содержались в обычных условиях вивария (естественное освещение, свободный доступ к воде и корму) в течение 2 недель; 1-я опытная ( $n = 20$ ) – животные получали мелатонин (препарат мелаксен, Unipharm, USA) с водой в дозе 4 мг/л постоянно в течение 2 недель и находились в условиях обычного освещения; 2-я – контрольная ( $n = 20$ ) – животные, которые содержались в условиях постоянного затемнения в течение 2 недель; 2-я опытная ( $n = 20$ ) – животные находились в условиях постоянного затемнения в течение 2 недель и получали мелатонин с водой постоянно в дозе 4 мг/л; 3-я контрольная ( $n = 20$ ) – животные находились в условиях обычного освещения и получали питьевую воду в течение 4 недель; 3-я опытная ( $n = 20$ ) – животные находились в условиях обычного освещения и получали мелатонин в дозе 4 мг/л с водой постоянно в течение 4 недель; 4-я контрольная ( $n = 20$ ) – животные находились в условиях постоянного затемнения в течение 4 недель; 4-я опытная ( $n = 20$ ) – животные получали мелатонин постоянно в дозе 4 мг/л с водой и находились в условиях затемнения.

Все действия, предусматривавшие контакт с экспериментальными животными, осуществлялись согласно «Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных» и в соответствии с «Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, использованных для экспериментов и в иных научных целях»,

В работе применялись следующие методы:

1) иммуногистохимический метод выявления CD1a- и CD3-позитивных клеток с помощью моноклональных антител фирмы Santa Cruz (USA).

Тимус извлекался после декапитации. Материал для исследования помещали в 10%-ный забуференный формалин и далее заливали в парафин. Парафиновые срезы толщиной 5 мкм были нанесены на высокоадгезивные стекла и подвергались сушке при комнатной температуре в течение 24 ч. Окраска препаратов происходила с помощью иммуногистохимических автоконтэйнеров AUTOSTAINER-360 (THERMO, Великобритания) и Leica BOND-MAX (Германия);

2) морфометрический анализ проводился с помощью программы Image J;

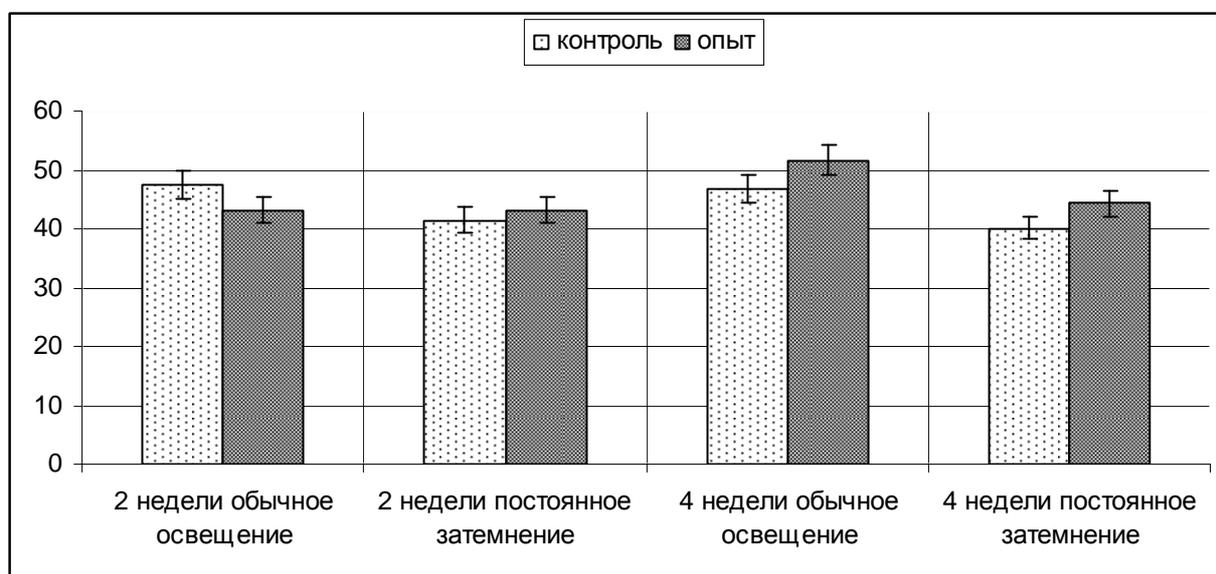
3) статистическая обработка полученных результатов проводилась с использованием программы SPSS Statistics 17.0 (2008).

## **Результаты исследования и их обсуждение**

При обработке гистологических срезов тимуса мышей контрольных и опытных групп CD1a-позитивные клетки располагаются в корковом веществе долек непосредственно под

капсулой органа. CD1a-позитивные клетки имеют округлую и овальную формы, мембраны их окрашиваются в коричневый цвет. Клетки, не несущие данный маркер, окрашены в синеголубой цвет.

Данные, полученные в ходе изучения CD1a-позитивных клеток в корковом веществе тимуса, демонстрируют, что ни световые условия, ни введение мелатонина не вызывают статистически значимых изменений количественных показателей кортикальных тимоцитов (рис. 1). Так, среднее число клеток в поле зрения (при увеличении 1000) составляет при содержании животных в обычных условиях освещения  $47,46 \pm 2,74$  и  $46,68 \pm 2,54$  клеток в поле зрения у контрольных,  $46,80 \pm 1,60$  и  $51,60 \pm 2,09$  клеток в поле зрения у опытных мышей (2 и 4 недели эксперимента соответственно), в условиях постоянного затемнения –  $41,50 \pm 1,97$  и  $40,16 \pm 2,49$  клеток в поле зрения у контрольных,  $43,20 \pm 2,36$  и  $44,30 \pm 2,47$  клеток в поле зрения у опытных мышей (2-я и 4-я недели эксперимента соответственно).



*Рис. 1. Количество CD1a-позитивных клеток в корковом веществе долек тимуса мышей опытных и контрольных групп*

CD1a – мембранный маркер кортикальных тимоцитов, необходим для развития Т-лимфоцитов, отсутствует на зрелых Т-клетках [7]. Ввиду этого CD1a-позитивные клетки являются незрелыми, и можно сделать вывод, что введение мелатонина в условиях обычного освещения и искусственного затемнения не оказывает влияния на дифференцировку клеток на ранней стадии развития тимоцитов.

CD3-позитивные клетки выявляются по всему срезу тимуса контрольных и опытных мышей с более плотным расположением в корковом веществе. Клетки имеют округлую и овальную формы, мембраны их окрашены в коричневый цвет.

Так, в корковом веществе дольки тимуса введение мелатонина в течение 2 недель в условиях обычного освещения приводит к снижению количества CD3-позитивных клеток с

548,06±11,79 до 415,02±9,24 ( $p < 0,001$ ) в поле зрения, в условиях постоянного затемнения – с 516,12±8,20 до 426,96±13,07 ( $p < 0,001$ ) в поле зрения (рис. 2). Более значительное снижение количества CD3-позитивных клеток наблюдается в корковом веществе долики тимуса мышей, получавших мелатонин в течение 4 недель в условиях обычного освещения – в 1,7 ( $p < 0,001$ ) и в условиях постоянного затемнения – в 1,6 раза ( $p < 0,001$ ).

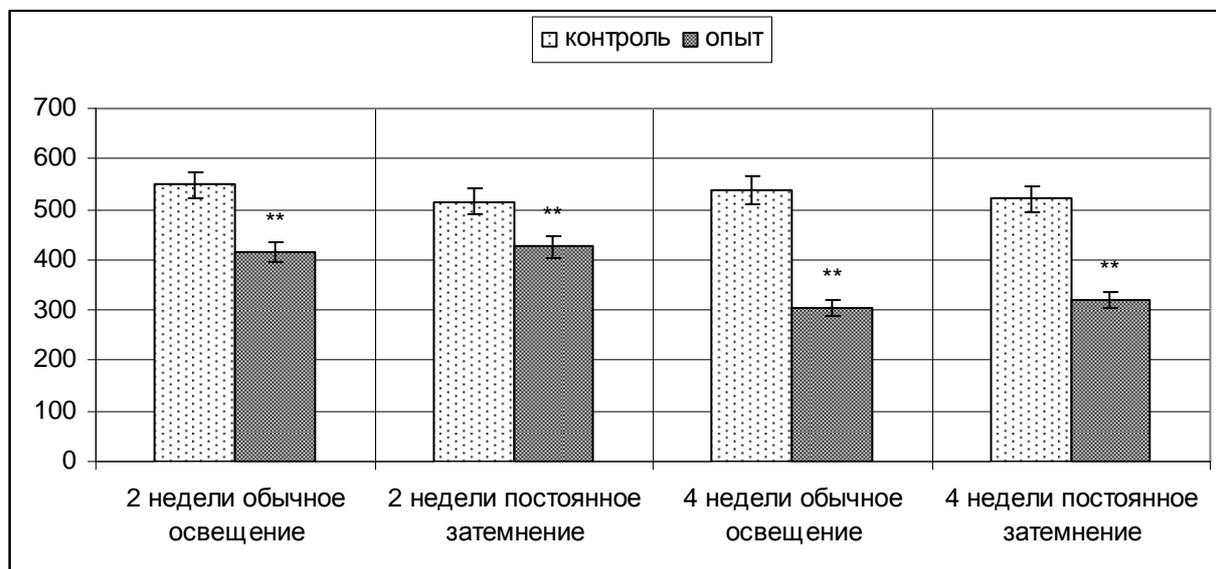


Рис. 2. Количество CD3-позитивных клеток в корковом веществе долек тимуса мышей опытных и контрольных групп. \*\* –  $p < 0,001$

Окраска препаратов тимуса экспериментальных мышей антителами к CD3 маркеру демонстрирует статистически значимое снижение количества CD3-позитивных клеток в мозговом веществе долек, степень выраженности которого напрямую зависит от длительности введения гормона (рис. 3). Так, в условиях обычного освещения введение мелатонина в течение 2 недель приводит к снижению числа CD3-позитивных клеток в поле зрения с 414,18±10,20 до 357,30±6,49 ( $p < 0,001$ ), а на 4-й неделе введения гормона более значительно – с 421,36±9,81 до 254,82±9,63 ( $p < 0,001$ ) клеток в поле зрения. Схожая картина наблюдается при введении мелатонина в условиях постоянного затемнения, где на 2-й неделе введения гормона число клеток в поле зрения постепенно снижается с 390,12±8,16 до 334,40±8,26 ( $p < 0,001$ ), а на 4-й неделе – с 403,30±12,38 до 237,20±6,49 ( $p < 0,001$ ) клеток в поле зрения.

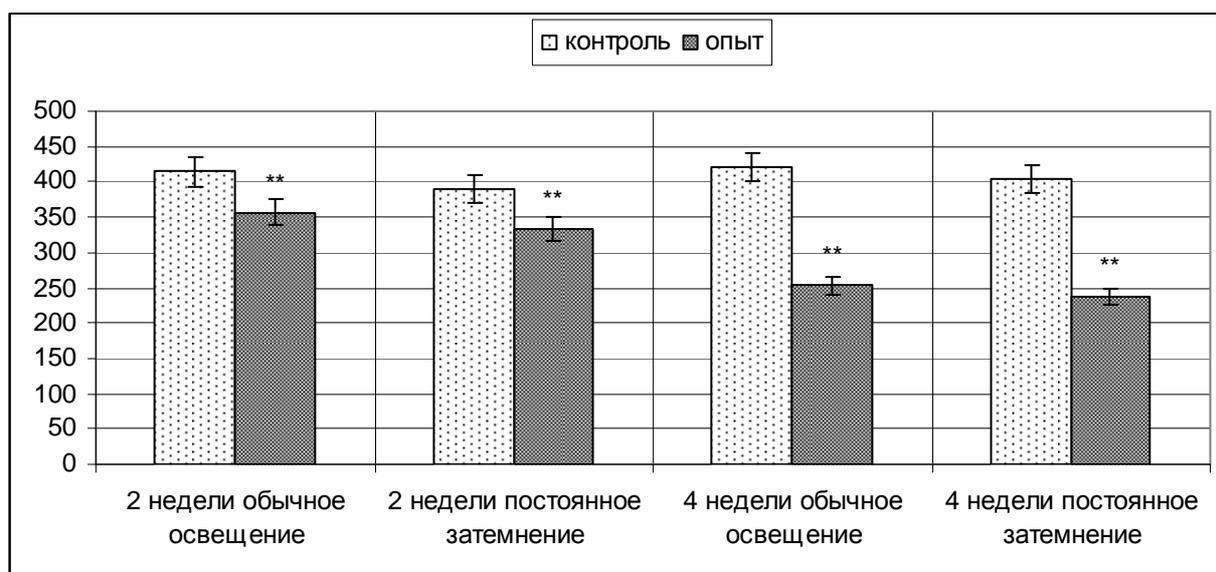


Рис. 3. Количество CD3-позитивных клеток в мозговом веществе долек тимуса мышей опытных и контрольных групп. \*\* –  $p < 0,001$

На границе коркового и мозгового вещества окраска срезов тимуса к маркеру CD3 также демонстрирует снижение количества исследуемых клеток, выраженность которого зависит от длительности поступления гормона в организм мышей (рис. 4). Так, количество CD3-позитивных клеток в поле зрения снижается при поступлении мелатонина в обычных условиях освещения в течение 2 недель с  $166,20 \pm 2,78$  до  $128,16 \pm 3,10$  ( $p < 0,001$ ), а в течение 4 недель – с  $158,72 \pm 2,13$  до  $110,72 \pm 2,78$  ( $p < 0,001$ ), при поступлении гормона в условиях постоянного затемнения в течение 2 недель – с  $149,02 \pm 4,29$  до  $132,76 \pm 4,17$  ( $p < 0,05$ ), в течение 4 недель – с  $152,32 \pm 2,86$  до  $107,76 \pm 2,52$  ( $p < 0,001$ ).

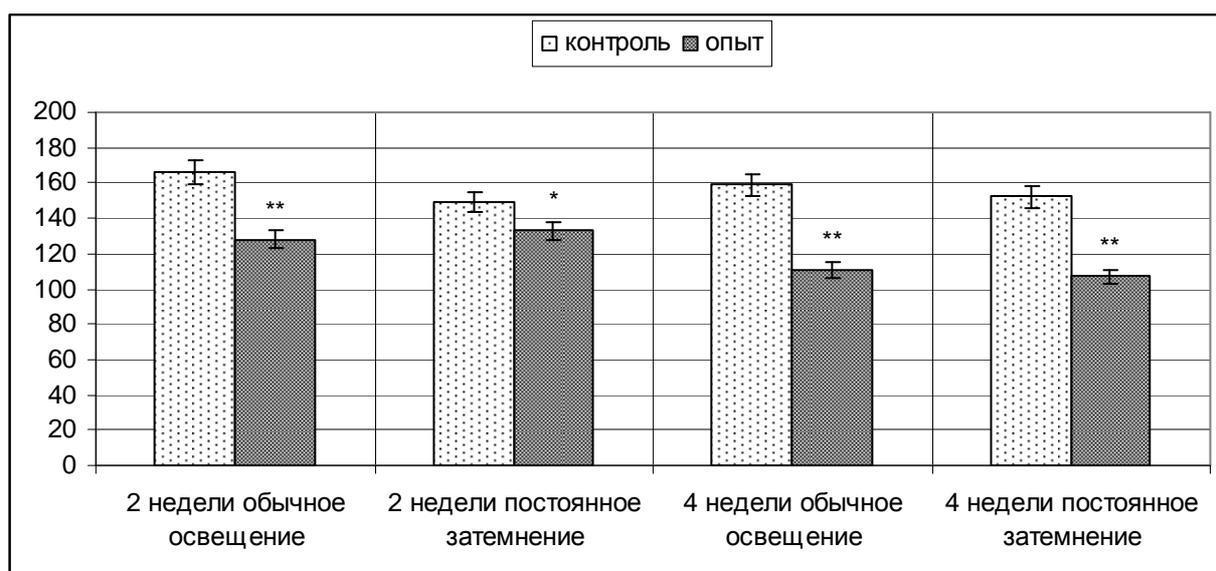


Рис. 4. Количество CD3-позитивных клеток на границе коркового и мозгового вещества долек тимуса мышей опытных и контрольных групп. \* –  $p < 0,05$ , \*\* –  $p < 0,001$

Так как CD3 антиген является высокоспецифичным маркером зрелых Т-лимфоцитов [4], то можно заключить, что снижение плотности расположения CD3-позитивных клеток в

дольке тимуса мышей после введения мелатонина в течение 2 и 4 недель в условиях различного освещения может быть связано с усиленной миграцией зрелых клеток из тимуса или стимуляцией их апоптоза.

### **Выводы**

1. Введение мелатонина в течение 2 и 4 недель в условиях обычного освещения и постоянного затемнения не вызывает статистически достоверных изменений количественных показателей CD1a-позитивных клеток в корковом веществе дольки тимуса экспериментальных животных.

2. Постоянное введение мелатонина экспериментальным мышам приводит к снижению количества CD3-позитивных клеток в корковом и мозговом веществе, а также на границе коркового и мозгового вещества долек тимуса, и эти изменения более выражены при поступлении гормона в течение 4 недель и не зависят от условий освещения.

### **Список литературы**

1. Арушанян Э.Б., Бейер Э.В. Гормон мозговой железы эпифиза мелатонин — универсальный естественный адаптоген // Успехи физиологических наук. 2012. Т. 43, № 3. С. 82–100.
2. Бородин Ю.И. Структурно-временная организация печени, лимфатической, иммунной, эндокринной систем при нарушении светового режима и введении мелатонина / Ю.И. Бородин, В.А. Труфакин, С.В. Мичурина, А.В. Шурлыгина. – Новосибирск: Издательский дом «Манускрипт», 2012. – 208 с.
3. Мендель В.Э., Мендель О.И. Мелатонин: роль в организме и терапевтические возможности. Опыт применения препарата Мелаксен в российской медицинской практике // Человек и лекарство. 2010. Т. 18, № 6. С. 336–341.
4. Cruz J. de la, Kruger T., Parks C. A., Silge R. L. et al. Basal and Antigen-Induced Exposure of the Proline-Rich Sequence in CD3 // Journal of immunology. 2011. V. 186. 4. URL: doi^10.4049/jimmunol.1003225.
5. Innominato P. F., Lim A. S., Palesh O. Clemons M. et al. The effect of melatonin on sleep and quality of life in patients with advanced breast cancer [Электронный ресурс] // Support Care Cancer. 2015. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26260726>
6. Kahya M. C., Naziroglu M., Cig B. Melatonin and selenium reduce plasma cytokine and brain oxidative stress levels in diabetic rats // Brain Injury. 2015. V. 5. P. 1–7.

7. Lockridge J. L., Chen X., Zhou Y., Rajesh et al. Analysis of the CD1 Antigen Presenting System in Humanized SCID Mice // PLoS One. 2011. V. 6. № 6. URL: doi: 10.1371/journal.pone.0021701.
8. Ozkanlar S., Kara A., Sengul E., Simsek N., Karadeniz A. Melatonin Modulates the Immune System Response and Inflammation in Diabetic Rats Experimentally-Induced by Alloxan // Horm Metab Res. 2015. V. 47. P. 1–8.
9. Raffi-El-Idrissi M., Pozo D., Calvo J. R. Specific binding of 2-(125J) iodmelatonin by rat splenocytes: characterization and its role of regulation of cyclic AMP production // Journal of Neuroimmunology. 1995. V.57. P. 171–178.
10. Zamfir Chiru A. A., Popescu C. R., Gheorghe D. C. Melatonin and cancer // J Med Life. 2014. V.7. № 3. P. 373–374.

**Рецензенты:**

Воронов Л.Н., д. б. н., профессор, заведующий кафедрой биологии и методики преподавания ФГБОУ ВПО «Чувашский государственный педагогический университет имени И.Я. Яковлева», г. Чебоксары;

Денисова Т.Г., д. м. н., профессор АУ ЧР «Институт усовершенствования врачей» МЗСР ЧР, г. Чебоксары.