

© О.А. Шатских, Е.М. Лузикова, 2012
УДК 611.43.018

О.А. Шатских и Е.М. Лузикова

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНАЯ РЕАКЦИЯ НАТУРАЛЬНЫХ КИЛЛЕРОВ И МАКРОФАГОВ СЕЛЕЗЕНКИ НА ВВЕДЕНИЕ МЕЛАТОНИНА ЖИВОТНЫМ, СОДЕРЖАЩИМСЯ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ СВЕТОВЫХ РЕЖИМАХ

Кафедра медицинской биологии (зав. — проф. С.П. Сапожников), Чувашский государственный университет им. И.Н. Ульянова, г. Чебоксары, e-mail: sdragon@mail.ru

Цель работы — изучение изменений CD57⁺- и CD68⁺-клеток (натуральных киллеров и макрофагов) селезенки на введение мелатонина мышам, содержащимся в различных условиях светового режима. Животным вводили мелатонин в дозе 0,03 мг/сут в течение 2 и 4 нед при обычном освещении и искусственном затемнении. Парафиновые срезы селезенки обрабатывали иммуногистохимическими методами для выявления CD57⁺- и CD68⁺-клеток. Исследования показали, что длительное введение мелатонина в условиях обычного освещения оказывает иммуносупрессивное действие, что подтверждается опустошением маргинальных зон, белой пульпы и всех зон красной пульпы, разрыхлением паренхимы и обнажением ретикулярной стромы органа. Длительное введение гормона в условиях искусственного затемнения оказывает иммуностимулирующее действие, на что указывает усиленный приток иммунокомпетентных клеток в селезенку, миграция их из белой пульпы в маргинальные зоны и эмиграция в системный кровоток, увеличение числа лимфоидных узелков. Количество CD57⁺- и CD68⁺-клеток увеличивается в периаартериальных лимфоидных муфтах селезенки и снижается в В-зависимых зонах этого органа.

Ключевые слова: селезенка, CD57⁺-клетки, CD68⁺-клетки, циркадианные ритмы, мелатонин

Биологические ритмы — это фундаментальное свойство живых организмов, обеспечивающее их способность к выживанию и адаптации в циклически меняющихся условиях внешней среды. Эндогенная природа биологических ритмов, в частности суточных, убедительно доказана [2, 3]. Шишковидная железа — составная часть фотонейроэндокринной системы, вырабатывает гормон мелатонин, участвующий в синхронизации циркадианных ритмов, оказывающий иммуностимулирующее действие, являющийся антиоксидантом [5, 6]. Мелатонин обнаруживает ноотропные свойства, угнетающе влияет на развитие опухолей [7], обладает нейротрансмиттерными функциями, влияет на все гипоталамо-гипофизарные гормоны [1, 3]. Отмечена также роль мелатонина в замедлении старения организма [11, 12]. Известно, что экзогенный мелатонин способен увеличивать количество натуральных киллеров и их активность, усиливать процессы фагоцитоза в селезенке [8–12], а изменение длины светового дня не оказывает значительного влияния на эти клетки [13]. Влияние мелатонина в разных условиях освещенности на макрофаги (CD68⁺-клетки) и натуральные киллеры (CD57⁺-клетки) селезенки изучено недостаточно.

Цель данной работы — изучение изменений CD57⁺- и CD68⁺-клеток селезенки при введении мелатонина животным, содержащимся в различных условиях освещения. Клетки макрофагального ряда и естественные киллеры являются звеном первичной иммунной защиты, поэтому для оценки иммунного статуса организма под

действием мелатонина были изучены CD57⁺- и CD68⁺-клетки. CD57 — маркер естественных киллеров; данный антиген присутствует также на единичных Т-лимфоцитах, В-лимфоцитах и моноцитах (значение которых в данной статье не учитываются). CD68⁺ — рецептор клеток, способных к фагоцитозу, — антиген макрофагов, моноцитов, единичных нейтрофилов, базофилов, больших лимфоцитов.

Материал и методы. Объектом гистологического исследования служила селезенка 30 взрослых белых нелинейных мышей-самцов 2-месячного возраста. Животные были разделены на 5 групп: 1-я — контрольная (n=6) — животные, которых содержали в обычных условиях вивария (естественное освещение 400 лк, влажность воздуха 90% кормление животных в период 8.00–9.00); 2-я — экспериментальная (n=6), животные получали препарат «Мелаксен» (мелатонин, применяющийся для регуляции сна, как адаптоген при повышенных нагрузках, при быстрой смене часовых поясов [7]) ежедневно в дозе 0,03 мг/сут в растворенном виде в течение 2 нед и находились в условиях обычного освещения; 3-я — экспериментальная (n=6), животные получали препарат «Мелаксен» ежедневно в дозе 0,03 мг/сут в течение 2 нед и находились в условиях искусственного затемнения; 4-я — экспериментальная (n=6), животные получали препарат «Мелаксен» ежедневно в дозе 0,03 мг/сут в течение 4 нед и находились в условиях обычного освещения; 5-я — экспериментальная (n=6), животные получали препарат «Мелаксен» ежедневно в дозе 0,03 мг/сут в течение 4 нед и находились в условиях искусственного затемнения. Препарат животные получали в растворенном виде из поилок ежедневно в 12 ч. Клетки были затемнены черной тканью, не пропускающей свет. Эксперимент проводили с октября по ноябрь в виварии в условиях естественного освещения (длина светового дня — 7,5–8 ч).

Селезенку у животных забирали на 14-е и 28-е сутки эксперимента во второй половине дня (14.00–15.00).

После фиксации в 10% растворе нейтрального формалина материал заливали в парафин. Срезы толщиной 5 мкм готовили на ротационном микротоме МПС-2 и после депарафинирования и регидратации погружали в восстанавливающий цитратный буфер (рН 6,0). Затем проводили высокотемпературную обработку прогреванием на водяной бане при температуре 90–95 °С в течение 30 мин с целью демаскировки искомым антигенов в тканях. Использованы следующие методы исследования:

1. Иммуногистохимический метод выявления CD57⁺- и CD68⁺-клеток с мышинными моноклональными антителами (МКАТ) к CD57 и CD68. После ингибирования эндогенной пероксидазы 3% раствором перекиси водорода на метаноле проводили иммуногистохимическую реакцию трехэтапным непрямым методом с использованием первичных МКАТ к гликопротеину CD57 (антиклон NK-1) и к антигенному маркеру макрофагов (CD68, клон KP1) в разведении 1:50 согласно рекомендации фирмы-изготовителя (LSAB-2, Dako, Дания). Визуализацию связавшихся первичных МКАТ проводили стандартным биотин-стрептавидин-пероксидазным методом с использованием набора LSAB-2 (Labeled Streptavidin Biotin System Peroxidase-2). Для оценки специфичности иммунного окрашивания в каждом случае делали отрицательный контроль (обработка вместо первичных контрольными антителами), результатом чего было отсутствие иммунного окрашивания. На заключительном этапе срезы докрашивали толуидиновым синим по Нисслю.

2. Метод подсчета клеток в 10 полях зрения под микроскопом Микмед-5 (ЛОМО, Россия) при увеличении 1000 с последующим вычислением среднего арифметического значения для представления о количестве окрашенных клеток в различных зонах белой и красной пульпы селезенки. Клетки подсчитывали в периартериоллярных лимфоидных муфтах (ПАЛМ), В-зависимой зоне — лимфоидных узелках (ЛУ), маргинальных синусах (МС), в периферической зоне красной пульпы (ПеЗКП), расположенной под капсулой в пограничной зоне красной пульпы (ПоЗКП); расположенной около ЛУ и глубокой зоне красной пульпы (ГЗКП), расположенной между ПеЗКП и ПоЗКП*.

3. Корреляционный анализ применяли для выявления взаимосвязи между количественными показателями распределения исследуемых клеток в разных функциональных зонах селезенки. Использовали шкалу цифровых выражений коэффициента корреляции (r) Чеддока. Взаимосвязь между показателями количества CD57⁺- и CD68⁺-клеток считали значимой при $r > 0,5$. Связь между количествами клеток считали умеренной при значениях $r = 0,5–0,7$, сильной — при $r = 0,7–0,9$ и полной — при $r > 0,9$. Также вычисляли средние значения количества структур и стандартные отклонения от них. Статистическую обработку полученных цифровых данных проводили по программе DVM486DX-2 с использованием пакета программ Microsoft office (Word и Excel). Статистическую значимость оценивали по t-критерию Стьюдента.

Все действия, предусматривавшие контакт с лабораторными животными, осуществляли с учетом требований «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных».

Результаты исследования. В ходе исследования было выявлено, что количество CD57⁺- и CD68⁺-клеток в ПАЛМ селезенки живот-

ных 2-й, 3-й и 5-й групп увеличивается (в 1,5–2,0 раза по сравнению с контролем), а 4-й группы — значительно снижается. В В-зависимой зоне селезенки 2-й, 3-й, 4-й и 5-й экспериментальных групп животных наблюдается снижение количества CD57⁺- и CD68⁺-клеток (в 2,0–2,5 раза).

В селезенке животных 2-й, 3-й и 5-й групп наблюдается множество тотально дегранулирующих CD57⁺- и CD-68⁺-клеток, заполняющих МС. Отмечено, что МС у животных 2-й и 3-й групп не полностью окружают ЛУ, а у 5-й группы мышей — полностью. Однако в селезенке животных 4-й группы количество CD57⁺- и CD68⁺-клеток в МС уменьшается в 2,5 раза по сравнению с контролем.

Количество CD57⁺-клеток в ПеЗКП селезенки у животных 2-й, 3-й и 5-й экспериментальных групп возрастает, а у 4-й группы — снижается. Количество же CD68⁺-клеток у мышей всех экспериментальных групп снижается, причем наиболее сильное снижение наблюдается в 4-й группе (в 3,5 раза) (рис. 1, а).

Отмечается повышение количества CD57⁺-клеток ГЗКП в селезенке у животных 2-й и 3-й групп и снижение — в 5-й группе; количество же CD68⁺-клеток в ГЗКП снижается у животных всех групп после введения гормона, с их полным исчезновением у мышей 4-й группы (см. рис. 1, б).

В ПоЗКП наблюдается снижение содержания CD57⁺-клеток у животных всех экспериментальных групп, а количества CD68⁺-клеток — во 2-й, 4-й и 5-й группах (см. рис. 1, в).

Абсолютное количество ЛУ в селезенке увеличивается у животных всех групп после введения препарата. При этом наибольшее их количество отмечается у животных 5-й экспериментальной группы (рис. 2).

Корреляционный анализ показал, что между количеством CD57⁺-клеток в ПАЛМ и В-зоне у контрольных животных имеется обратная умеренная корреляционная связь ($r = -0,6$, $P < 0,032$), которая исчезает у животных 2-й, 3-й и 5-й групп, но становится прямой и сильной ($r = 0,82$, $P < 0,002$) у мышей 4-й группы.

Между количеством CD57⁺-клеток в ПАЛМ и ПоЗКП у животных 2-й группы выявлена обратная умеренная корреляционная связь ($r = -0,64$, $P < 0,02$), а у экспериментальных животных 3-й и 5-й групп — обратная сильная корреляционная связь ($r = -0,885$, $P < 0,003$ и $r = -0,81$, $P < 0,002$).

Между количеством CD68⁺-клеток ПАЛМ и ГЗКП у животных 2-й и 3-й групп появляется сильная обратная корреляционная связь ($r = -0,81$, $P < 0,002$ и $r = -0,83$, $P < 0,001$) и умеренная обратная корреляционная связь ($r = -0,67$, $P < 0,01$) — между количеством CD68⁺-клеток в ПАЛМ и ПоЗКП у животных 5-й группы.

Анализ количества CD57⁺- и CD68⁺-клеток в различных структурах селезенки показал полное

* Разделение красной пульпы на зоны и их наименование предложены авторами настоящей работы и отсутствуют в Гистологической терминологии.

отсутствие корреляции у животных 1-й, 2-й и 5-й групп.

Обсуждение полученных данных. Проведенные исследования показали, что введение мелатонина вызывает сходные изменения гистологических структур селезенки у животных 2-й, 3-й и 5-й групп. В частности, у животных 2-й и 3-й групп появляются дегранулирующие CD57⁺- и CD68⁺-клетки в МЗ; их количество увеличивается у животных 5-й группы. Местом формирования иммунного ответа, независимо от вида антигена и способа его введения, всегда является маргинальная зона (МЗ). Макрофаги МЗ не только стимулируют миграцию лимфоцитов, но и играют большую роль при транспорте иммунных комплексов к герминативным центрам [4], следовательно, повышение количества макрофагов свидетельствует об активации иммунитета у животных исследуемых групп [5]. На это же указывает увеличение содержания натуральных киллеров, обеспечивающих цитокиновое воздействие, необходимое для иммунной активации макрофагов (интерферон-гамма), продукцию других цитокинов — фактора некроза опухолей, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор, интерлейкин-5, интерлейкин-8, уничтожение клеток-мишеней путем секреторного и несекреторного лизиса, а также антитело-зависимой клеточной цитотоксичности [4].

Также у мышей 2-й, 3-й и 5-й групп наблюдается увеличение количества CD57⁺-и CD68⁺-клеток в ПАЛМ, что указывает на усиленный приток иммунокомпетентных клеток в селезенку. Этот эффект при параллельном снижении количества данных клеток в В-зависимой зоне свидетельствует об их усиленной миграции из белой пульпы в МЗ.

Анализ выявил исчезновение обратной умеренной корреляционной связи количества CD57⁺-клеток в ПАЛМ и В-зависимой зоне у животных 2-й, 3-й и 5-й групп и появление сильной прямой корреляционной связи у мышей 4-й группы, что, вероятно, объясняется усилением миграции исследуемых клеток из белой пульпы в МЗ у животных 2-й, 3-й и 5-й групп и задержкой CD57⁺-клеток в белой пульпе мышей 4-й группы.

Параллельное повышение количества CD57⁺- и CD68⁺-клеток в ПАЛМ при одновременном снижении их количества в исследуемых зонах красной пульпы свидетельствует об активном выселении клеток в системный кровоток, что подтверждается наличием обратной умеренной корреляционной

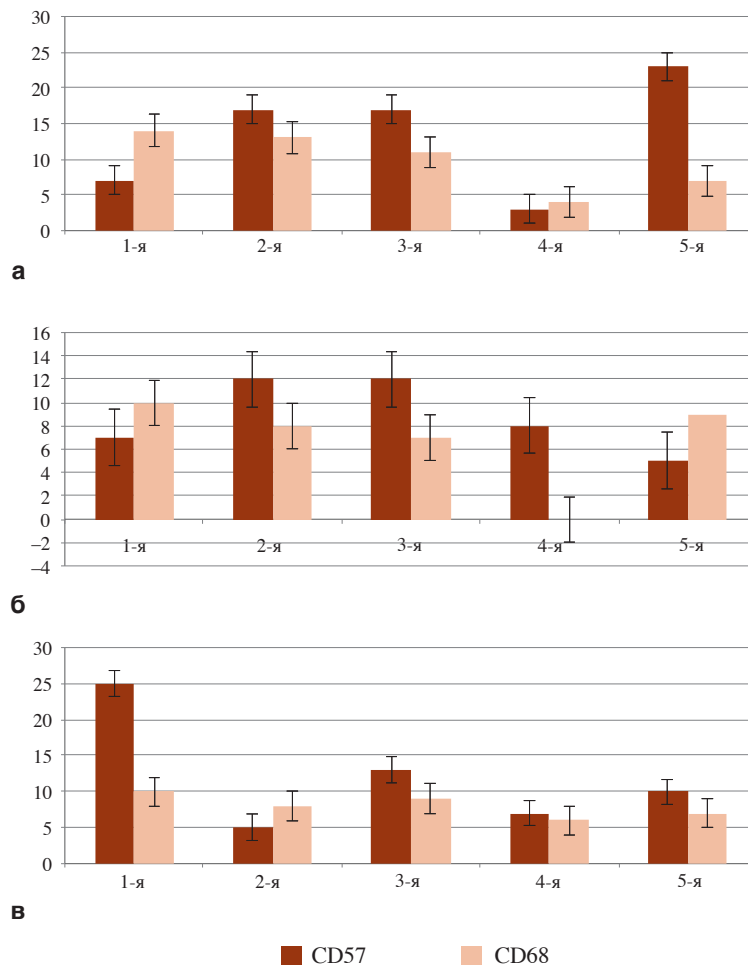


Рис. 1. Количество CD57⁺- и CD68⁺-клеток в красной пульпе селезенки у животных различных групп под влиянием мелатонина; а — в периферическом отделе; б — в глубокой зоне; в — в пограничной зоне.

По оси абсцисс — группы животных; по оси ординат — число клеток в поле зрения при ув. 1000. 1-я — контрольная группа; 2-я и 3-я — введение мелатонина в дозе 0,03 мг/сут в течение 2 нед при обычном освещении и искусственном затемнении соответственно; 4-я и 5-я — введение мелатонина в дозе 0,03 мг/сут в течение 4 нед при обычном освещении и искусственном затемнении соответственно. Вертикальные отрезки — значения стандартной ошибки.

связи между количеством CD57⁺-клеток в ПАЛМ и ПоЗКП селезенки у животных 2-й группы и обратной сильной корреляционной связи у животных 3-й и 5-й групп. Также между количеством CD68⁺-клеток ПАЛМ и ГЗКП у животных 2-й и 3-й групп появляется сильная обратная корреляционная связь и умеренная обратная корреляционная связь — между количеством CD68⁺-клеток ПАЛМ и ПоЗКП у животных 5-й группы.

Мелатонин увеличивает массу селезенки [12], что согласуется с нашими данными об абсолютном возрастании количества лимфоидных узелков.

В селезенке у мышей 2-й, 3-й и 5-й экспериментальных групп наблюдается увеличение количества клеток лимфоидной ткани, что подтверждается наличием большего числа ЛУ и развитыми ПАЛМ по сравнению с контрольными животными (особен-

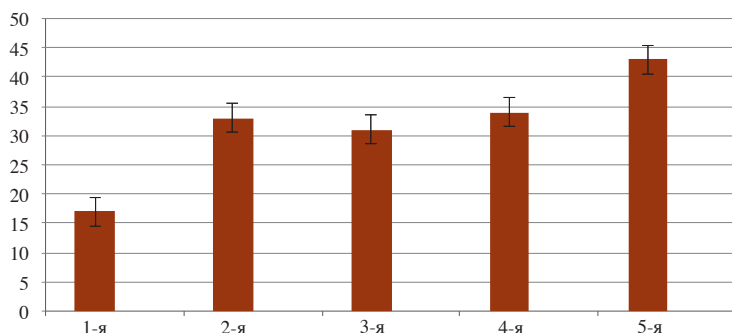


Рис. 2. Абсолютное количество лимфоидных узлов селезенки у животных различных групп при воздействии мелатонина.

По оси абсцисс — группы животных; по оси ординат — число лимфоидных узлов на срезе. Остальные обозначения см. на рис. 1.

но выражены изменения у животных 5-й экспериментальной группы).

Таким образом, можно сделать вывод, что усиленный приток $CD57^{+}$ - и $CD68^{+}$ -клеток в ПАЛМ, усиленная миграция этих клеток во все зоны селезенки, активные процессы в МС и увеличение количества ЛУ у животных 2-й, 3-й и 5-й экспериментальных групп свидетельствует о проявлении иммуностимулирующего действия мелатонина.

В селезенке у мышей 4-й группы наблюдались следующие структурные изменения: опустошение МЗ, белой пульпы и всех зон красной пульпы, разрыхление паренхимы и обнажение ретикулярной стромы органа, что является проявлением иммуносупрессивного действия в результате длительного введения мелатонина в условиях обычного освещения.

Таким образом, мелатонин активизирует иммунную систему животных, находящихся в темноте в течение 4 нед, и угнетает ее у животных, находящихся в условиях обычного освещения. Двухнедельное введение мелатонина не вызывает иммуносупрессии.

Данный факт можно объяснить десинхронизацией циркадианных ритмов, вызванной длительным введением мелатонина в течение светового дня, что резко нарушает естественный суточный ритм секреции гормона [5].

ЛИТЕРАТУРА

1. Анисимов В.Н. Мелатонин и его место в современной медицине. Русский мед. журн., 2006, т. 14, № 4, с. 269–274.
2. Губский В.И. и Губский Л.В. Циркадные ритмы и механизмы циркадной организации. Успехи соврем. биол., 1968, т. 68, с. 23–44.
3. Деряпа Н.Р., Мошкин М.П. и Посный В.С. Проблемы медицинской биоритмологии. М., Медицина, 1985.
4. Дранник Г.Н. Клиническая иммунология и аллергология. Одесса, АстроПринт, 1999.
5. Мендель В.Э. и Мендель О.И. Мелатонин: роль в организме и терапевтические возможности. Опыт применения препарата Мелаксен в российской медицинской практике. Человек и лекарство. Ч. 2, 2010, т. 18, № 6, с. 336–342.

6. Парахонский А.П. Влияние мелатонина на иммунную систему. Современные наукоемкие технологии, 2007, № 11, с. 59.
7. Bartsch C., Bartsch H., Blask D.E. et al. The Pineal Gland and Cancer. Neuroimmunoendocrine Mechanisms in Malignancy. Berlin: Springer, 2001.
8. Currier N.L. and Miller S.C. Echinacea purpurea and melatonin augment natural-killer cells in leukemic mice and prolong life span. J. Altern. Complement. Med., 2001, v. 7, № 3, p. 241–251.
9. Fernandez-Tresguerres Hernandez J.A. Effects of hormones on aging of the CNS, the immune system and the skin in rats. An. R. Acad. Nac. Med. (Madr.), 2004, v. 121, № 1, p. 157–176.
10. Franca E.L., Feliciano N.D., Silva K.A. et al. Modulatory role of melatonin on superoxide release by spleen macrophages isolated from alloxan-induced diabetic rats. Bratisl. Lek. Listy, 2009, v. 110, № 9, p. 517–522.
11. Kim Y.O., Pyo M.Y. and Kim J.H. Influence of melatonin on immunotoxicity of lead. Int. J. Immunopharmacol., 2000, v. 22, № 10, p. 821–832.
12. Tian Y.M., Zhang G.Y. and Dai Y.R. Melatonin rejuvenates degenerated thymus and redresses peripheral immune functions in aged mice. Immunol. Lett., 2003, v. 88, № 2, p. 101–104.
13. Yellon S.M. and Tran L.T. Photoperiod, reproduction, and immunity in select strains of inbred mice. J. Biol. Rhythms, 2002, v. 17, № 1, p. 65–75.

Поступила в редакцию 20.03.2011
Получена после доработки 28.01.2012

MORPHO-FUNCTIONAL REACTION OF SPLEEN NATURAL KILLER CELLS AND MACROPHAGES TO MELATONIN ADMINISTRATION TO THE ANIMALS KEPT ON DIFFERENT ILLUMINATION REGIMENS

O.A. Shatskykh and Ye.M. Luzikova

The aim this investigation was to study the changes in the numbers of spleen $CD57^{+}$ and $CD68^{+}$ cells (natural killer cells and macrophages respectively) after melatonin administration to the animals kept on different illumination regimens. The experimental animals were given melatonin in dose of 0.03 mg per day for 2 and 4 weeks under conditions of natural illumination or artificial darkening. Spleen paraffin sections were stained using immunohistochemical methods for detection of $CD57^{+}$ and $CD68^{+}$ cells. It was shown that long-term administration of melatonin under conditions of natural illumination had an immunosuppressive effect, that was manifested by the depopulation of the marginal zones, white pulp and all the zones of the red pulp, parenchyma loosening and denudation of the reticular stroma of the organ. However, long-term hormone administration under conditions of artificial darkening had an immunostimulatory effect as evidenced by the increased inflow of immunocompetent cells into the spleen, their migration from the white pulp into the marginal zones and emigration into peripheral blood flow, concomitant with the increase in the number of lymphoid nodules. The number of $CD57^{+}$ and $CD68^{+}$ cells was increased in splenic periarterial lymphoid sheaths and decreased in B-dependent zones of the organ.

Key words: spleen, $CD57^{+}$ cells, $CD68^{+}$ cells, circadian rhythms, melatonin

Department of Medical Biology, I.N. Ulyanov Chuvash State University, Cheboksary