

Е.М. ЛУЗИКОВА, В.Е. СЕРГЕЕВА, Н.Е. ГИМАЛДИНОВА

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ СВЕТОВОГО РЕЖИМА И МЕЛАТОНИНА НА ИНТЕНСИВНОСТЬ ИНВОЛЮЦИИ ТИМУСА КРЫС, ОПОСРЕДОВАННУЮ СЕРОТОНИНСОДЕРЖАЩИМИ ТУЧНЫМИ КЛЕТКАМИ

Ключевые слова: мелатонин, фотопериод, тимус, серотонин, тучные клетки, адипоциты.

Целью настоящей работы явилось изучение влияния мелатонина на серотонинсодержащие тучные клетки тимуса крыс и их роли в инволюции тимуса в разных световых условиях.

Материалы и методы. Крысы-самцы линии Wistar ($n = 60$) были разделены на шесть групп: первую и вторую содержали в условиях естественного фотопериода, третью и четвертую – в условиях постоянного затемнения, пятую и шестую группы – в условиях постоянного освещения в течение 4 недель. Мелатонин получали животные второй, четвертой и шестой групп в форме препарата «Мелаксен» ad libitum в концентрации 4 мг/л с питьевой водой в течение 4 недель. Иммуноцитохимическую реакцию (5-гидрокситриптамин, 5-HT) и люминесцентно-гистохимические методы применялись для избирательного выявления серотонина, катехоламинов и гистамина.

Результаты и обсуждение. Постоянное освещение (24/24) приводит к уменьшению количества тучных клеток в участках атрофии тимуса крыс. Введение мелатонина увеличивает количество тучных клеток независимо от условий освещения. Содержание серотонина в ТК снижается в условиях постоянного затемнения и повышается в условиях постоянного освещения. Мелатонин повышает содержание серотонина в тучных клетках только в условиях постоянного затемнения.

Постоянное затемнение (0/24) приводит к уменьшению количества белых адипоцитов, а постоянное освещение (24/24) приводит к увеличению количества белых адипоцитов в зонах инволюции. Введение мелатонина уменьшает количество белых адипоцитов независимо от условий освещения. Измерение оптической плотности серотонина в белых адипоцитах показало, что постоянное освещение снижает содержание серотонина в исследуемых клетках. Экзогенный мелатонин увеличивает содержание серотонина в адипоцитах при постоянном затемнении и уменьшает его при постоянном освещении.

Нами выявлена прямая сильная корреляционная зависимость между содержанием серотонина в тучных клетках и адипоцитах околотимусной белой жировой ткани ($r = 0,82$; $p < 0,05$) в группе контрольных животных, которая усиливается, если испытуемые животные находятся в условиях постоянного освещения ($r = 0,99$; $p < 0,05$).

Выводы. Установлено, что уменьшение количества адипоцитов в участках инволюции при затемнении связано со снижением выработки серотонина тучными клетками, а увеличение количества адипоцитов при постоянном освещении – с усилением секреции серотонина тучными клетками.

Актуальность Акцидентальная инволюция тимуса представляет собой морфологическую перестройку органа в ответ на любые чрезвычайно сильные стрессорные влияния [5, 23]. К таким воздействиям относят удлинённый световой период в цикле свет/темнота [19], что типично для ритма жизни современного человека. Нарушение циркадных ритмов влияет на развитие опухолей: мужчины, трудящиеся в ночные смены, чаще остальных подвержены риску развития рака предстательной железы [9, 16]. У женщин, которые работают по ночам, повышается риск развития рака молочной железы [7, 8]. Развитие опухолей

различного генеза является проявлением иммуносупрессии [18], вызванной искусственным сдвигом фотопериода в световую часть.

Известно, что функциональная связь между тучными клетками (ТК), клетками фибробластического ряда и адипоцитами играет решающую роль в развитии акцидентальной инволюции тимуса [21]. Тимус по количеству тучных клеток занимает второе место после кожи, а по функциональной активности ТК приближен к ней [20].

Доказано, что серотонин и мелатонин регулируют пролиферацию и созревание лимфоцитов, адипоцитов, липогенез и липолиз. Активация липолиза в белых адипоцитах осуществляется через серотониновые рецепторы HTR2B. Периферический серотонин жировой ткани является аутокринным элементом, который необходим для дифференцировки преадипоцитов через рецепторы HTR2A и HTR2C в адипоциты [10]. В ряде работ показано ингибирующее действие постоянного освещения на иммунные клетки, опосредованное подавлением синтеза мелатонина [17] или опосредованным действием через гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковую ось [13]. Недостаточное освещение, напротив, индуцирует эпифизарную гиперфункцию [22]. В наших предыдущих исследованиях мы показали, что отсутствие естественной смены темновой и световой фаз в цикле свет/темнота (24/24 и 0/24) приводит к увеличению содержания серотонина в клетках диффузной эндокринной системы тимуса, а эффекты экзогенного мелатонина зависят от светового режима организма [2]. Логично предположить, что синтез серотонина в ТК будет зависеть от светового режима организма и, возможно, окажет влияние на интенсивность атрофических процессов.

Цель исследования – изучение влияния мелатонина на серотонинсодержащие тучные клетки тимуса крыс и их роли в инволюции тимуса в разных световых условиях.

Материал и методы исследования. В эксперименте использованы крысы-самцы линии Wistar ($n = 60$) в возрасте 8 недель с массой тела 150–180 г. Животные были разделены на шесть групп по 10 крыс (табл. 1): первую и вторую группы содержали в условиях естественного фотопериода, третью и четвёртую – в условиях постоянного затемнения, пятую и шестую группы – в условиях постоянного освещения в течение 4 недель.

Таблица 1

Дизайн экспериментального исследования влияния фотопериода и мелатонина на серотонинсодержащие клетки тимуса

Параметры	Условия эксперимента					
	естественный фотосинтез		постоянное затемнение		постоянное освещение	
	экспериментальная группа					
	I	II	III	IV	V	VI
Продолжительность светового дня, ч	8–9	8–9	–	–	24	24
Освещённость утром, лк	50–150	50–150	0–0,5		55	
Освещённость пасмурным днём, лк	до 500	до 500				
Освещённость ясным днём, лк	до 1000	до 1000				
Освещённость вечером, лк	100–200	100–200				
Концентрация мелатонина в питьевой воде «Сестрица», мг/л	–	4	–	4	–	4
Физиологическая доза для крысы без учёта 15%-ной усвояемости, мг	–	0,01	–	0,01	–	0,01
Доза для крысы с учётом 15%-ной усвояемости, мг	–	0,09	–	0,09	–	0,09

Мелатонин получали животные второй, четвёртой и шестой групп в форме препарата «Мелаксен» *ad libitum* в концентрации 4 мг/л с питьевой водой в течение 4 недель. Данные о морфологической реакции тучных клеток и жировой ткани тимуса на изменение световых условий получали, сравнивая первую, вторую и третью группы. Данные о различиях в реакции серотонинсодержащих тучных клеток и адипоцитов на поступление мелатонина в организм в разных световых условиях получали, сравнивая первую, вторую, третью и четвёртую, пятую и шестую группы.

Экспериментальные исследования осуществляли в соответствии с протоколом № 6, утверждённым этическим комитетом ФГОУ ВПО «Чувашский государственный университет им. И.Н. Ульянова» от 01.03.2013.

Мелатонин вводили перорально («Мелаксен» Unipharm, Inc., США) *ad libitum* в концентрации 4 мг/л с питьевой водой, в течение 4 недель, поскольку он легко проникает через кишечный и гематоэнцефалический барьеры, после экзогенного введения присутствует в крови и мозге в высоких концентрациях [24].

Тимус у животных извлекали после действия диоксида углерода на 28-е сутки эксперимента во второй половине дня (15:00–17:00) и фиксировали в 10% формалине с последующей заливкой в парафин для общегистологических и иммунологических методов исследования. Производили депарафинизацию препаратов в ксилоле и регидратацию в спиртах снижающейся концентрации с последующей промывкой в дистиллированной воде в течение 5 мин. Затем блокировали эндогенную пероксидазу в 3% водном растворе перекиси водорода в течение 10 мин при комнатной температуре, после чего промывали в дистиллированной воде 4 мин и переносили стекла в 0,01 М фосфатно-солевой буфер (pH = 7,4) на 7 мин. Инкубацию производили в 5% растворе бычьего сывороточного альбумина, фракция V по Кону (Serva, Германия, Fluka, США) на фосфатно-солевом буфере – 10 мин при комнатной температуре. Затем удаление бычьего сывороточного альбумина без промывки, инкубация с первичными мышинными моноклональными антителами (клон 5-НТ-Н209, DAKO, Дания, в разведении производителя 1:50) в течение 30 мин, во влажной камере при 37°C, с последующей промывкой в фосфатно-солевом буфере (5 мин). Инкубация со стрептавидин-пероксидазой (из набора LSAB2 – DAKO, Дания) 10–15 мин при комнатной температуре, промывка в ФСБ в течение 5–10 мин; в заключение проводили инкубацию с раствором 3,3-диаминобензидинтетрагидрохлорида («DAB+», Dako, Дания) под визуальным контролем (3 мин) с последующей промывкой в дистиллированной воде (5 мин) [4, 6].

Иммуноцитохимическую реакцию на серотонин (5-гидрокситриптамин, 5-НТ) использовали для выявления серотонина в клетках, способных синтезировать или накапливать этот моноамин [2], в частности, в клетках стромы и паренхимы тимуса [15].

В ходе работы применялись следующие люминесцентно-гистохимические методы исследования.

1. Метод Фалька – Хилларпа в модификации Е.М. Крохиной применялся для избирательного выявления катехоламинов и серотонина [3]. Срезы исследуемых органов инкубировались в параформальдегидной камере (параформальдегид) в течение 60 минут при температуре 80 °С. Метод основан на конденсации моноаминов с формальдегидом с образованием флуоресцирующих соединений. Полученные препараты исследовались с помощью флуоресцентного микроскопа Leica DM4000 B Fluorescence Motorized Microscope Unit3.

2. Метод Кросса, Эвена, Роста для выявления клеток, содержащих гистамин [3], с целью определения гистамина в тканях основан на реакции паров ортофталевого альдегида с гистамином, в ходе которой образуются флуоресцирующие производные имидазолилэтиламина. Срезы обрабатывались в предварительно разогретой камере парами ортофталевого альдегида (1,2-benzendicarboxaldehyde, Jianghong chemicals, Китай) в термостате при температуре 100°C в течение 10 с. Затем срезы при той же температуре на 2 минуты помещались в другую камеру, содержащую пары воды. Далее срезы высушивались в термостате при температуре 70°C в течение 5 мин. Полученные препараты исследовались с помощью флуоресцентного микроскопа Leica DM4000 B Fluorescence Motorized Microscope Unit3 при длине волны возбуждающего света 360 нм.

3. Метод цитоспектрофлуориметрии для идентификации и количественного измерения содержания катехоламинов, серотонина и гистамина в исследуемых структурах тимуса. Для этого на люминесцентном микроскопе Leica была установлена дополнительная насадка ФМЭЛ-1А с выходным напряжением 900 В. Для определения серотонина использовался светофильтр № 8 с длиной волны 525 нм, для гистамина – № 7 с длиной волны 515 нм и для катехоламинов – фильтр № 6 с длиной волны 480 нм. Показания снимали с табло усилителя У-5 в милливольтках.

4. Определение серотонинового индекса (J_s) – безразмерной величины, являющейся средней величиной от суммы частных соотношений содержания серотонина и катехоламинов в одной и той же клетке.

$$J_s = \frac{[C]}{[KA] / N},$$

где [C] – содержание серотонина; [KA] – содержание катехоламинов; N – число наблюдений. По динамике уровней биогенных аминов не всегда можно достоверно судить об их влиянии на интегральную биоаминную обеспеченность органа и иммуногенез. Даже при нарастании концентрации серотонина влияние его может уменьшаться в зависимости от динамики катехоламинов. Подсчёт клеток был произведён с использованием программы SigmaScan Pro5 и микроскопа Carl Zeiss Axio Scope A1 при увеличении $\times 400$. Выводы о содержании серотонина в клетках делали путём измерения оптической плотности вещества в 100 клетках по каждому животному с помощью программы SigmaScan Pro5.

Описательная статистическая обработка произведена с использованием программы Statistica 17 (США). Данные по интенсивности люминесценции и экспрессии белков-маркёров по каждой группе животных усредняли и вычисляли стандартную ошибку. Был произведен корреляционный анализ Спирмена для непараметрических данных.

Результаты исследования и их обсуждение. У крыс контрольных групп тучные клетки выявляются в междольковой соединительной ткани тимуса, в капсуле, в участках инволюции тимуса, в околотимусной жировой ткани. Единично ТК выявляются в корковом веществе долек. ТК в тимусе животных контрольной группы имеют неправильную овальную форму, хорошо определяемые гранулы, не выходящие за пределы цитоплазматической мембраны. В участках инволюции тимуса тучные клетки выявляются чаще, чем в неизменной паренхиме (рис. 1), что объясняется их ведущей ролью в адипогенезе [11].

Установлено, что количество тучных клеток под воздействием постоянного света в зонах инволюции снижается в 1,7 раза ($p = 0,007$) (табл. 2).

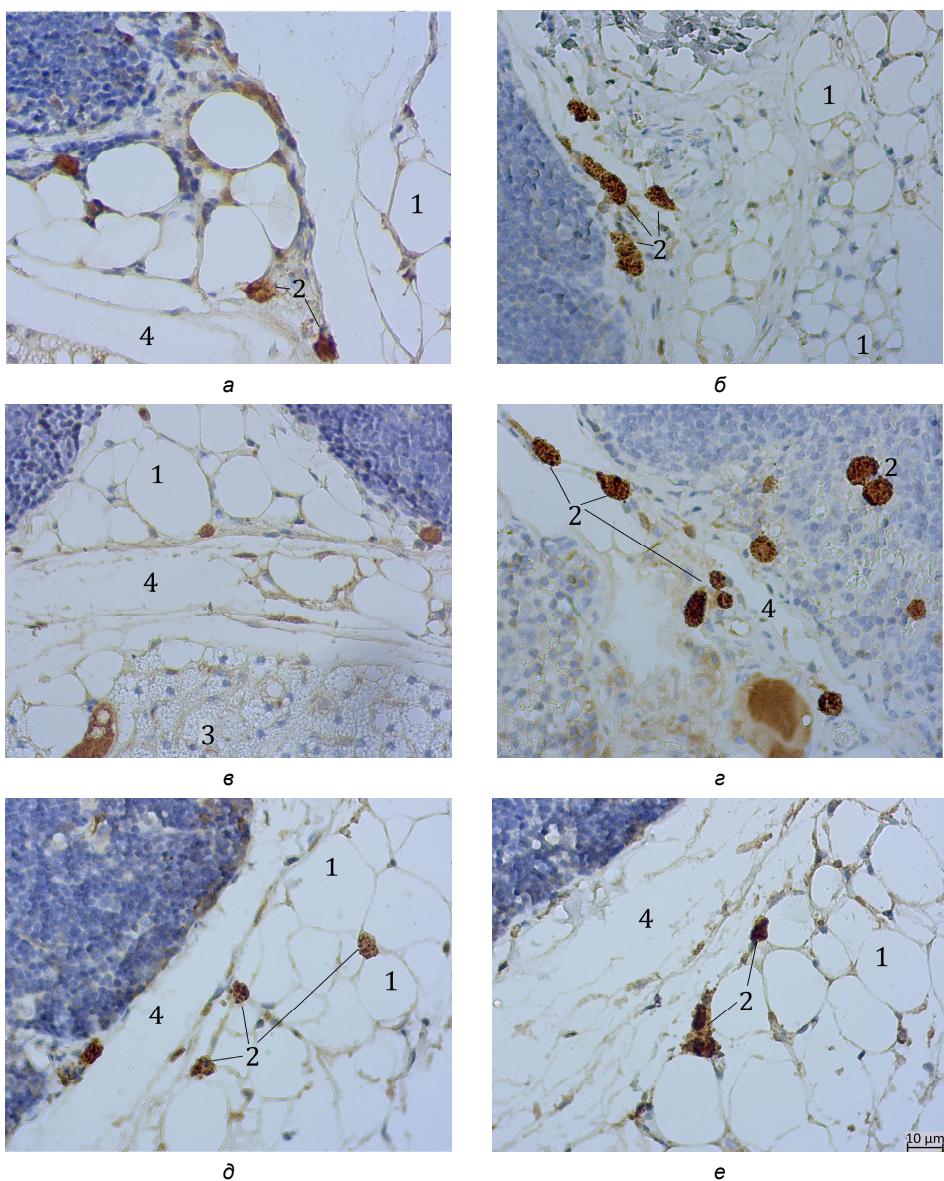


Рис. 1. Тучные клетки в околотимусной жировой ткани разных экспериментальных групп:
 а – животные, содержащиеся при естественном освещении;
 б – животные, содержащиеся при естественном освещении и получавшие мелатонин;
 в – животные, содержащиеся в условиях затемнения;
 г – животные, содержащиеся в условиях затемнения и получавшие мелатонин;
 д – животные, содержащиеся при постоянном освещении;
 е – животные, содержащиеся при постоянном освещении и получавшие мелатонин в течение 4 недель:
 1 – белые адипоциты, 2 – тучные клетки, 3 – бурый адипоцит, 4 – капилляр.
 Иммуногистохимическая реакция на серотонин с использованием моноклональных антител
 (клон 5HT-H209, DAKO, Дания).
 Увеличение 400 микроскопа Zeiss Primo Star

Таблица 2

Количество тучных клеток и адипоцитов
в тимусе экспериментальных крыс (в 1 мм²) при введении мелатонина
в различных световых условиях (M±m)

Параметр	Условия эксперимента					
	естественный фотопериод		постоянное затемнение		постоянное освещение	
	экспериментальная группа					
	I	II	III	IV	V	VI
Количество ТК в септах тимуса	13±1	19±1 <i>p</i> = 0,007*	15±1	26±1 <i>p</i> = 0,002* <i>p</i> = 0,006**	5±0,5 <i>p</i> = 0,007*	9±1 <i>p</i> = 0,007* <i>p</i> = 0,05***
Количество ТК в паренхиме тимуса	11±1	13±1 <i>p</i> = 0,003*	13±2 <i>p</i> = 0,05*	17±1 <i>p</i> = 0,01* <i>p</i> = 0,05**	4±1 <i>p</i> = 0,008*	11±1 <i>p</i> = 0,02* <i>p</i> = 0,002***
Количество ТК в зонах инволюции тимуса	16±1	23±3 <i>p</i> = 0,001*	14±1	24±2 <i>p</i> = 0,01**	9±1 <i>p</i> = 0,007*	12±0,5 <i>p</i> = 0,01* <i>p</i> = 0,004***
Количество белых адипоцитов в зонах инволюции	138±7	92±4 <i>p</i> = 0,01*	68±4 <i>p</i> = 0,05*	47±2 <i>p</i> = 0,05**	167±9 <i>p</i> = 0,001*	89±6 <i>p</i> = 0,01***
Количество промежуточных форм адипоцитов в зонах инволюции	6±0,3	5±0,6 <i>p</i> = 0,05*	7±1 <i>p</i> = 0,001*	16±0,5 <i>p</i> = 0,001**	4±1,6 <i>p</i> = 0,001**	6±0,6 <i>p</i> = 0,001**

Примечание. * – сравнение с I группой, ** – сравнение с III группой, *** – сравнение с V группой.

Введение мелатонина в естественных световых условиях и при отсутствии фотопериода приводит к увеличению количества тучных клеток по сравнению с таковым в группах с аналогичными световыми условиями без введения мелатонина: в естественных световых условиях наблюдается увеличение в 1,4 раза ($p \leq 0,001$), в условиях затемнения – в 1,7 раза ($p \leq 0,01$) и при постоянном освещении – в 1,3 раза ($p = 0,004$).

С помощью иммуногистохимического (ИГХ) метода с использованием моноклональных антител (клон 5HT-H209, ДАКО, Дания) и люминесцентно-гистохимического (ЛГХ) метода Фалька – Хилларпа было установлено, что содержание серотонина в ТК зависит от светового режима.

ИГХ метод показал, что в условиях затемнения уменьшается содержание серотонина в ТК зон инволюции в 2 раза ($p = 0,01$). Введение мелатонина в условиях отсутствия фотопериода приводит к росту содержания серотонина в ТК в 1,4 раза ($p \leq 0,001$).

ЛГХ методом выявили аналогичное снижение в 2 раза ($p \leq 0,01$) содержания серотонина в ТК зон инволюции при постоянном затемнении. В условиях постоянного освещения, когда содержание плазменного мелатонина падает, содержание серотонина в ТК возрастает в 1,4 раза ($p \leq 0,01$) (рис. 2). Введение мелатонина приводит к увеличению содержания серотонина в ТК в естественных световых условиях в 1,3 раза ($p \leq 0,01$), в условиях отсутствия фотопериода – в 1,5 раза ($p \leq 0,01$), а при постоянном освещении содержание серотонина уменьшается в 1,3 раза ($p \leq 0,01$).

Введение мелатонина независимо от световых условий приводит также к увеличению содержания серотонина в ТК: в естественных световых условиях и в условиях затемнения – в 1,2 раза ($p \leq 0,01$ и $p \leq 0,001$ соответственно), в условиях постоянного освещения – в 1,4 раза ($p \leq 0,0004$) (рис. 3).

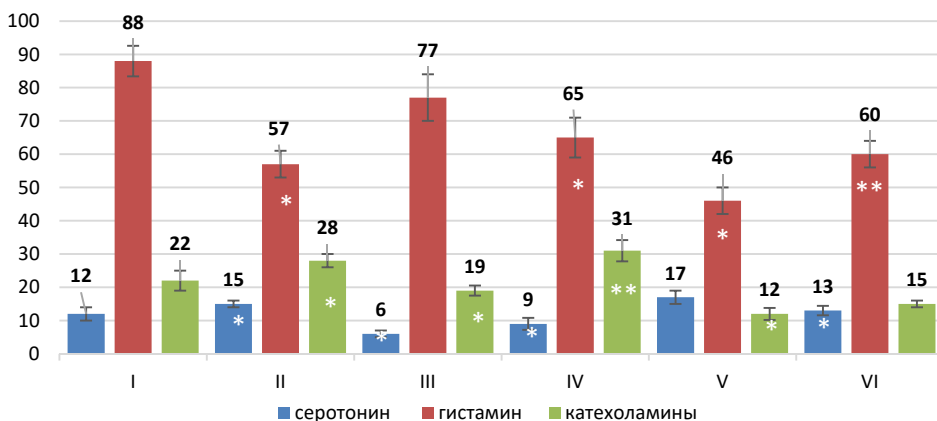


Рис. 2. Изменение содержания биогенных аминов (ЛГХ метод) в тучных клетках участков инволюции тимуса в ответ на введение мелатонина в разных световых условиях, выявленное люминесцентно-гистохимическими методами:
 I – животные, содержащиеся при естественном освещении;
 II – животные, содержащиеся при естественном освещении и получавшие мелатонин;
 III – животные, содержащиеся в условиях затемнения;
 IV – животные, содержащиеся в условиях затемнения и получавшие мелатонин;
 V – животные, содержащиеся при постоянном освещении;
 VI – животные, содержащиеся при постоянном освещении и получавшие мелатонин в течение 4 недель;
 Примечание. * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,001$.

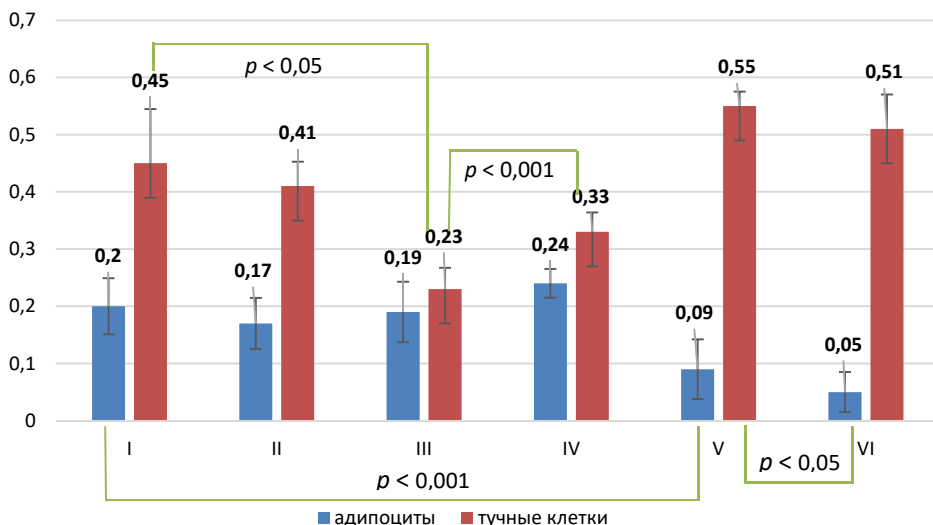


Рис. 3. Изменение содержания серотонина (ИГХ метод): в адипоцитах и ТК тимуса крыс линии Wistar, получавших мелатонин в разных световых условиях:
 I – животные, содержащиеся при естественном освещении;
 II – животные, содержащиеся при естественном освещении и получавшие мелатонин;
 III – животные, содержащиеся в условиях затемнения;
 IV – животные, содержащиеся в условиях затемнения и получавшие мелатонин;
 V – животные, содержащиеся при постоянном освещении;
 VI – животные, содержащиеся при постоянном освещении и получавшие мелатонин в течение 4 недель

Несмотря на то, что экзогенный мелатонин, введенный в разных световых условиях, увеличивает абсолютное содержание серотонина и катехоламинов, он не влияет на их соотношение при естественном цикле свет/темнота и в условиях отсутствия фотопериода (табл. 3), что, возможно, является еще одной положительной характеристикой данного гормона. Серотониновый индекс в тучных клетках тимуса животных, содержащихся в естественных световых условиях и в условиях постоянного затемнения, не превышает 1, что свидетельствует о преобладании катехоламинов. В условиях затемнения серотониновый индекс снижается, свидетельствуя о повышении влияния катехоламинов на лимфоцитарную паренхиму. Катехоламины усиливают пролиферацию лимфоцитов, повышают устойчивость к апоптозу [14], стимулируют созревание Т-лимфоцитов [12]. Эти факты соотносятся с нашими данными, в которых пролиферативная активность увеличивается при введении мелатонина в естественных световых условиях и в условиях затемнения и снижается при постоянном освещении [1]. Наши исследования показали повышение количества ТК и содержания катехоламинов в них в участках инволюции тимуса животных, содержащихся в условиях постоянного освещения. В этих условиях серотониновый индекс становится больше 1, что свидетельствует о преобладании серотонина. Таким образом, в естественных световых условиях и в условиях отсутствия фотопериода преобладает влияние катехоламинов, а в условиях постоянного освещения – серотонина.

Таблица 3

**Серотониновый индекс отношения серотонина к гистамину и катехоламинам
в тучных клетках зон инволюции тимуса крыс**

Показатель	Экспериментальная группа					
	I	II	III	IV	V	VI
С/КА	0,6±0,01	0,5±0,01	0,3±0,02	0,3±0,01	1,4±0,01	0,9±0,03
С/Г	0,1±0,04	0,3±0,03	0,1±0,03	0,1±0,05	0,4±0,03	0,2±0,04

Примечание. С/КА – среднее от отношений уровня серотонина к уровню катехоламинов; С/Г – отношение среднего значения уровня катехоламинов к среднему значению уровней гистамина.

Отсутствие фотопериода (0/24) приводит к уменьшению количества белых адипоцитов в зонах инволюции в 2 раза ($p < 0,05$), а отсутствие темновой фазы (24/24) увеличивает количество белых адипоцитов в 1,2 раза ($p < 0,001$). Введение мелатонина уменьшает количество белых адипоцитов в естественных световых условиях в 1,4 раза ($p < 0,001$), в условиях затемнения – в 1,4 раза ($p < 0,05$), в условиях постоянного освещения наблюдается снижение в 1,9 раза ($p < 0,001$) (см. табл. 2). Следует отметить увеличение количества промежуточных форм адипоцитов при постоянном затемнении и снижение их при постоянном освещении, что объясняется, возможно, активностью ТК [25] и увеличением их количества при постоянном освещении и снижением количества ТК при постоянном затемнении.

В наших исследованиях достоверное изменение содержания серотонина в белых адипоцитах в ответ на изменение светового режима мы наблюдаем только в условиях постоянного освещения: оптическая плотность серотонина снижается в 2,2 раза ($p < 0,001$). Экзогенный мелатонин повышает содержание серотонина в адипоцитах тимуса крыс, содержащихся в темноте в 1,3 раза ($p < 0,001$), а в адипоцитах тимуса животных, содержащихся при постоянном освещении, содержание серотонина снижается в 1,8 раза ($p < 0,05$) (см. рис. 3).

Нами отмечается прямая сильная корреляционная зависимость между оптической плотностью серотонина в тучных клетках и адипоцитах околотимусной белой жировой ткани ($r = 0,82$; $p < 0,05$) в группе контрольных животных. Корреляционные связи средней силы наблюдаются между оптической плотностью серотонина и площадью адипоцитов белой жировой ткани ($r = 0,52$; $p < 0,05$), между оптической плотностью серотонина в ТК и площадью адипоцитов бурой жировой ткани ($r = 0,60$; $p < 0,05$).

Введение мелатонина в условиях естественного ритма свет/темнота вызывает ослабление корреляционных связей между оптической плотностью серотонина в тучных клетках и адипоцитах околотимусной белой жировой ткани ($r = 0,32$; $p < 0,05$). Одновременно происходит появление обратной сильной корреляционной связи между оптической плотностью серотонина в ТК и площадью адипоцитов бурой жировой ткани ($r = -0,75$; $p < 0,05$) и прямой корреляционной связи средней силы между количеством ТК и площадью бурых адипоцитов ($r = 0,70$; $p < 0,05$).

Отсутствие световой фазы в цикле свет/темнота (0/24) приводит к аналогичным изменениям корреляционных связей, как и при введении мелатонина в естественных световых условиях: между оптической плотностью серотонина в тучных клетках и адипоцитах околотимусной бурой жировой ткани ($r = -0,71$; $p < 0,05$) и прямой корреляционной связи средней силы между количеством ТК и площадью бурых адипоцитов ($r = 0,72$; $p < 0,05$).

Введение мелатонина при постоянном затемнении приводит к появлению сильных прямых корреляционных связей между оптической плотностью серотонина в ТК и в адипоцитах белой жировой ткани ($r = 0,99$; $p < 0,05$), между количеством ТК и оптической плотностью серотонина в адипоцитах ($r = 0,86$; $p < 0,05$), между количеством ТК и содержанием серотонина в ТК ($r = 0,86$; $p < 0,05$).

Отсутствие темновой фазы в цикле свет/темнота (24/24) приводит к разрушению корреляционных связей, имевшихся у контрольных животных. При введении мелатонина животным, содержащимся при постоянном освещении, снова появляются сильная корреляционная связь между содержанием серотонина в ТК и содержанием серотонина в белых адипоцитах ($r = 0,99$; $p < 0,05$) и прямые корреляционные связи средней силы между содержанием серотонина в ТК и площадью бурых адипоцитов ($r = 0,61$; $p < 0,05$), между содержанием серотонина в адипоцитах и площадью бурых адипоцитов ($r = 0,62$; $p < 0,05$).

Таким образом, уменьшение количества адипоцитов в участках инволюции при затемнении связано со снижением выработки серотонина тучными клетками, а увеличение количества адипоцитов при постоянном освещении связано с увеличением секреции серотонина тучными клетками.

Выводы. 1. Постоянное освещение (24/24) приводит к уменьшению количества тучных клеток в участках атрофии тимуса. Введение мелатонина увеличивает количество тучных клеток, независимо от условий освещения. Содержание серотонина в ТК снижается в условиях постоянного затемнения и повышается в условиях постоянного освещения. Мелатонин повышает содержание серотонина в тучных клетках только в условиях постоянного затемнения.

2. Постоянное затемнение (0/24) приводит к уменьшению количества белых адипоцитов, а постоянное освещение (24/24) приводит к увеличению количества белых адипоцитов в зонах инволюции. Введение мелатонина уменьшает количество белых адипоцитов, независимо от условий освещения. Исследование содержания серотонина в белых адипоцитах показало, что постоянное освещение снижает содержание серотонина в исследуемых клетках.

Экзогенный мелатонин увеличивает содержание серотонина при постоянном затемнении и уменьшает его при постоянном освещении.

3. В естественных световых условиях и в условиях отсутствия фотопериода преобладает влияние катехоламинов, а в условиях постоянного освещения – серотонина. Выявлена сильная прямая корреляционная связь между содержанием серотонина в тучных клетках и адипоцитах.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Исследование не имело источника финансирования.

Литература

1. Влияние фотопериода и экзогенного мелатонина на пролиферацию и апоптоз лимфоцитов селезенки / Е.М. Лузикова, Л.В. Оганесян, О.А. Ефремова и др. // Медицинский вестник Северного Кавказа. 2022. Т. 17, № 1. С. 64–67.
2. Влияние фотопериода на серотонинергическую систему вилочковой железы и его роль в реализации эффектов экзогенного мелатонина / Е.М. Лузикова, В.Е. Сергеева, А.В. Московский и др. // Казанский медицинский журнал. 2022. Т. 103, № 5. С. 788–796.
3. Гордова В.С., Сергеева В.Е., Сапожников С.П. Морфологическая адаптация внутренних органов к поступлению в организм водорастворимого соединения кремния. Чебоксары: Изд-в Чуваш. ун-та, 2021. 208 с.
4. Григорьев И.П., Коржевский Д.Э. Современные технологии визуализации тучных клеток для биологии и медицины (обзор) // Современные технологии в медицине. 2021. №4. С. 93–109.
5. Ровда Ю.И., Ведерникова А.В., Силантьева И.В., Миняйлова Н.Н. Аспекты вилочковой железы (тимуса) детского возраста (Часть I) // Мать и дитя в Кузбассе. 2020. № 4(83). С. 59–69. DOI: 10.24411/2686-7338-2020-10050.
6. Коржевский Д.Э., Драй Р.В., Костюкевич С.В. Иммуноцитохимический метод выявления ЕС- (энтерохромоаффинных) клеток эпителия слизистой оболочки кишки крысы // Морфология. 2008. Т. 133, № 1. С. 78–81.
7. Agbaria S., Haim A., Fares F., Zubidat A.E. Epigenetic modification in 4T1 mouse breast cancer model by artificial light at night and melatonin – the role of DNA-methyltransferase. *Chronobiol Int.*, 2019, vol. 36(5), pp. 629–643. DOI: 10.1080/07420528.2019.1574265.
8. Abecia J.A., Garrido C., Gave M. et al. Exogenous melatonin and male foetuses improve the quality of sheep colostrum. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*, 2020, vol. 104(5), pp. 1305–1309. DOI: 10.1111/jpn.13362.
9. Barul C., Richard H., Parent M.E. Night-Shift Work and Risk of Prostate Cancer: Results From a Canadian Case-Control Study, the Prostate Cancer and Environment Study. *American journal of epidemiology*, 2019. vol. 188 (10). pp. 1801–1811. DOI: 10.1093/aje/kwz167.
10. Choi W.G., Choi W., Oh T.J. et al. Inhibiting serotonin signaling through HTR2B in visceral adipose tissue improves obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest.*, 2021, vol. 131(23), e145331. DOI: 10.1172/JCI145331.
11. Finlin B.S., Confides A.L., Zhu B. et al. Adipose Tissue Mast Cells Promote Human Adipose Beiging in Response to Cold. *Sci Rep.*, 2019, vol. 9(1), p. 8658. DOI: 10.1038/s41598-019-45136-9.
12. Francelin C., Veneziani L.P., Farias A.D.S. et al. Neurotransmitters Modulate Intrathymic T-cell Development. *Front Cell Dev Biol.*, 2021, vol. 9, 668067. DOI: 10.3389/fcell.2021.668067.
13. Goncharova N., Chigarova O., Oganyan T. Age-related and individual features of the HPA axis stress responsiveness under constant light in nonhuman primates. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2023, vol. 13, 1051882. DOI: 10.3389/fendo.2022.1051882.
14. Laukova M., Vargovic P., Vlcek M. et al. Catecholamine production is differently regulated in splenic T- and B-cells following stress exposure. *Immunobiology*, 2013, vol. 218(5), pp. 780–789. DOI: 10.1016/j.imbio.2012.08.279.
15. Lifantseva N.V., Koneeva T.O., Voronezhskaya E.E., Melnikova V.I. Expression of components of the serotonergic system in the developing rat thymus. *Dokl Biochem Biophys.*, 2017, vol. 477(1), pp. 401–404. DOI: 10.1134/S160767291700151.
16. Mancio J., Leal C., Ferreira M. et al. Does the association of prostate cancer with night-shift work differ according to rotating vs. fixed schedule? A systematic review and meta-analysis. *Prostate Cancer Prostatic Dis.*, 2018, no. 36, pp. 337–344. DOI: 10.1038/s41391-018-0040-2.
17. Mizutani H., Tamagawa-Mineoka R., Yasuike R. et al. Effects of constant light exposure on allergic and irritant contact dermatitis in mice reared under constant light conditions. *Exp Dermatol.*, 2021, vol. 30(5), pp. 739–744. DOI: 10.1111/exd.14308.

18. *Odinokov D., Hamblin M.R.* Aging of lymphoid organs: Can photobiomodulation reverse age-associated thymic involution via stimulation of extrapineal melatonin synthesis and bone marrow stem cells? *J Biophotonics*, 2018, vol. 11(8), e201700282. DOI: 10.1002/jbio.201700282.

19. *Quaglini D., Capri M., Zecca L. et al.* The effect on rat thymocytes of the simultaneous in vivo exposure to 50-Hz electric and magnetic field and to continuous light. *Scientific World Journal*, 2004, vol. 4(2), pp. 91–99. DOI: 10.1100/tsw.2004.183.

20. *Ribatti D., Crivellato E.* The role of mast cell in tissue morphogenesis. Thymus, duodenum, and mammary gland as examples. *Exp Cell Res.*, 2016, vol. 341(1), pp. 105–109. DOI: 10.1016/j.yexcr.2015.11.022.

21. *Ribatti D.* Hans Selye and his studies on the role of mast cells in calciphylaxis and calcergy. *Inflamm Res.*, 2019, vol. 68(2), pp. 177–180. DOI: 10.1007/s00011-018-1199-7.

22. *Semenenko S.B., Karatieieva S.Y., Bakun O.V. et al.* Peculiarities of the functioning circadian organization the ion-regulating function of kidney under the condition of pineal gland hyperfunction of the influence nitrogen monoxide synthesis blockade. *Wiad Lek.*, 2019, vol. 72(2), pp. 234–238.

23. *Suzuki K., Kitami A., Okada M. et al.* Evaluation of age-related thymic changes using computed tomography images: A retrospective observational study. *Medicine (Baltimore)*, 2022, vol. 101(32), e29950. DOI: 10.1097/MD.00000000000029950.

24. *Tarocco A., Caroccia N., Morciano G. et al.* Melatonin as a master regulator of cell death and inflammation: molecular mechanisms and clinical implications for newborn care. *Cell Death Dis.*, 2019, vol. 10(4), p. 317. DOI: 10.1038/s41419-019-1556-7.

25. *Zhang X., Wang X., Yin H. et al.* Functional Inactivation of Mast Cells Enhances Subcutaneous Adipose Tissue Browning in Mice. *Cell Rep.*, 2019, vol. 28(3), pp. 792–803.e4. DOI: 10.1016/j.celrep.2019.06.044.

ЛУЗИКОВА ЕЛЕНА МИХАЙЛОВНА – кандидат биологических наук, доцент кафедры общей и клинической морфологии и судебной медицины, Чувашский государственный университет, Россия, Чебоксары (nema76@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1217-0985>).

СЕРГЕЕВА ВАЛЕНТИНА ЕФРЕМОВНА – доктор биологических наук, профессор кафедры медицинской биологии с курсом микробиологии и вирусологии, Чувашский государственный университет, Россия, Чебоксары (kafedra-biology@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3471-5226>).

ГИМАЛДИНОВА НАТАЛЬЯ ЕВГЕНЬЕВНА – кандидат медицинских наук, доцент кафедры общей и клинической морфологии и судебной медицины, Чувашский государственный университет, Россия, Чебоксары (ngimaldinova@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2475-3392>).

Elena M. LUZIKOVA, Valentina E. SERGEEVA, Natalia E. GIMALDINOVA

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF LIGHT REGIME AND MELATONIN ON THE INTENSITY OF THYMUS INVOLUTION IN RATS MEDIATED BY SEROTONIN-CONTAINING MAST CELLS

Key words: melatonin, photoperiod, thymus, serotonin, mast cells, adipocytes.

The purpose of this work was to study the effect of melatonin on serotonin-containing mast cells of rat thymus and their role in thymus involution in different light conditions.

Materials and methods. Male Wistar rats ($n = 60$) were divided into six groups: the first and second were kept under conditions of natural photoperiod, the third and fourth – under conditions of constant obscuring, the fifth and sixth groups – under conditions of continuous illumination for 4 weeks. Melatonin was received by animals of the second, fourth and sixth groups in the form of the drug "Melaxen" ad libium at the concentration of 4 mg / l with drinking water for 4 weeks. Immunocytochemical reaction (5-hydroxytryptamine, 5-HT) and luminescent histochemical methods were used for selective detection of serotonin, catecholamines and histamine.

Results and discussion. Continuous illumination (24/24) leads to a decrease in the number of mast cells in the areas of thymus atrophy in rats. Administration of melatonin increases the number of mast cells regardless of lighting conditions. The content of serotonin in MCs decreases in conditions of constant obscuring and increases in conditions of continuous illumination. Melatonin increases the content of serotonin in mast cells only in conditions of constant obscuring.

Constant obscuring (0/24) results in a decrease in the number of white adipocytes, and continuous illumination (24/24) leads to an increase in the number of white adipocytes in the

involution zones. Melatonin introduction reduces the number of white adipocytes regardless of lighting conditions. Measurement of serotonin optical density in white adipocytes showed that continuous illumination reduces the content of serotonin in the cells under study. Exogenous melatonin increases the serotonin content in adipocytes in constant obscuring and decreases it in continuous illumination.

We revealed a direct strong correlation dependence between the content of serotonin in mast cells and adipocytes of perithymic white adipose tissue ($r = 0.82$; $p < 0.05$) in the group of control animals, which increased if the test animals were in continuous lighting conditions ($r = 0.99$; $p < 0.05$).

Conclusions. A decrease in the number of adipocytes in the involution sites in obscuring conditions was found to be associated with a decrease in the production of serotonin by mast cells, and an increase in the number of adipocytes under continuous illumination is associated with an increase in serotonin secretion by mast cells.

References

1. Luzikova E.M., Oganessian L.V., Efremova O.A. et al. Vliyaniye fotoperioda i ekzogenogo melatonina na proliferatsiyu i apoptoz limfotsitov selezenki [The effect of photoperiod and exogenous melatonin on proliferation and apoptosis of spleen lymphocytes]. *Meditsinskiy vestnik Severnogo Kavkaza*, 2022, vol. 17, no. 1, pp. 64–67. DOI: 10.14300.mnnc.2022.17017.
2. Luzikova E.M., Sergeeva V.E., Moskovskii A.V. et al. Vliyaniye fotoperioda na serotoninergicheskuyu sistemu vilochkovoi zhelezy i ego rol' v realizatsii effektov ekzogenogo melatonina [The effect of the photoperiod on the serotonergic system of the thymus and its role in the implementation of the effects of exogenous melatonin]. *Kazanskiy meditsinskii zhurnal*, 2022, vol. 103, no. 5, pp. 788–796. DOI: 10.17816.kmj2022.788.
3. Gordova V.S., Sergeeva V.E., Sapozhnikov S.P. Morphological adaptation of visceral organs to the introduction of a water-soluble form of silicon [Morphological adaptation of visceral organs to the introduction of a water-soluble form of silicon]. *Cheboksary, Chuvash State University Publ.*, 2021, 208 p.
4. Grigor'ev I.P., Korzhhevskii D.E. Sovremennyye tekhnologii vizualizatsii tuchnykh kletok dlya biologii i meditsiny (obzor) [Modern Imaging Technologies of Mast Cells for Biology and Medicine (Review)]. *Sovremennyye tekhnologii v meditsine*, 2021. no 4, pp. 93–109.
5. Rovda Yu.I., Vedernikova A.V., Silant'eva I.V., Mynyailova N.N. Aspekty vilochkovoi zhelezy (timusa) detskogo vozrasta (chast' I) [Aspects of the thymus gland (thymus) of childhood (Part I)]. *Mat' I ditya*, 2020. no 4(83), pp. 59–69. DOI: 10.24411/2686-7338-2020-10050.
6. Korzhhevskii D.E., Drai R.V., Kostyukevich S.V. Immunotsitokhimicheskii metod vyyavleniya EC-(enterokhromaffinnykh) kletok epiteliya slizistoi obolochki kishki krysy [Immunocytochemical method for the demonstration of EC- (enterochromaffin) cells in the gut mucosal epithelium of the rat]. *Morfologiya*, 2008. vol. 133, no. 1, pp. 78–81.
7. Agbaria S., Haim A., Fares F., Zubidat A.E. Epigenetic modification in 4T1 mouse breast cancer model by artificial light at night and melatonin – the role of DNA-methyltransferase. *Chronobiol Int.*, 2019, vol. 36(5), pp. 629–643. DOI: 10.1080/07420528.2019.1574265.
8. Abecia J.A., Garrido C., Gave M. et al. Exogenous melatonin and male fetuses improve the quality of sheep colostrum. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*, 2020, vol. 104(5), pp. 1305–1309. DOI: 10.1111/jpn.13362.
9. Barul C., Richard H., Parent M.E. Night-Shift Work and Risk of Prostate Cancer: Results From a Canadian Case-Control Study, the Prostate Cancer and Environment Study. *American journal of epidemiology*, 2019. vol. 188 (10). pp. 1801–1811. DOI: 10.1093/aje/kwz167.
10. Choi W.G., Choi W., Oh T.J. et al. Inhibiting serotonin signaling through HTR2B in visceral adipose tissue improves obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest.*, 2021, vol. 131(23), e145331. DOI: 10.1172/JCI145331.
11. Finlin B.S., Confides A.L., Zhu B. et al. Adipose Tissue Mast Cells Promote Human Adipose Beiging in Response to Cold. *Sci Rep.*, 2019, vol. 9(1), p. 8658. DOI: 10.1038/s41598-019-45136-9.
12. Francelin C., Veneziani L.P., Farias A.D.S. et al. Neurotransmitters Modulate Intra-thymic T-cell Development. *Front Cell Dev Biol.*, 2021, vol. 9, 668067. DOI: 10.3389/fcell.2021.668067.
13. Goncharova N., Chigarova O., Oganyan T. Age-related and individual features of the HPA axis stress responsiveness under constant light in nonhuman primates. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2023, vol. 13, 1051882. DOI: 10.3389/fendo.2022.1051882.
14. Laukova M., Vargovic P., Vlcek M. et al. Catecholamine production is differently regulated in splenic T- and B-cells following stress exposure. *Immunobiology*, 2013, vol. 218(5), pp. 780–789. DOI: 10.1016/j.imbio.2012.08.279.
15. Lifantseva N.V., Koneeva T.O., Voronezhskaya E.E., Melnikova V.I. Expression of components of the serotonergic system in the developing rat thymus. *Dokl Biochem Biophys.*, 2017, vol. 477(1), pp. 401–404. DOI: 10.1134/S160767291700151.

16. Mancio J., Leal C., Ferreira M. et al. Does the association of prostate cancer with night-shift work differ according to rotating vs. fixed schedule? A systematic review and meta-analysis. *Prostate Cancer Prostatic Dis.*, 2018, no. 36, pp. 337–344. DOI: 10.1038/s41391-018-0040-2.
17. Mizutani H., Tamagawa-Mineoka R., Yasuie R. et al. Effects of constant light exposure on allergic and irritant contact dermatitis in mice reared under constant light conditions. *Exp Dermatol.*, 2021, vol. 30(5), pp. 739–744. DOI: 10.1111/exd.14308.
18. Odinokov D., Hamblin M.R. Aging of lymphoid organs: Can photobiomodulation re-verse age-associated thymic involution via stimulation of extrapineal melatonin synthesis and bone marrow stem cells? *J Biophotonics*, 2018, vol. 11(8), e201700282. DOI: 10.1002/jbio.201700282.
19. Quagliano D., Capri M., Zecca L. et al. The effect on rat thymocytes of the simultaneous in vivo exposure to 50-Hz electric and magnetic field and to continuous light. *Scientific World Journal*, 2004, vol. 4(2), pp. 91–99. DOI: 10.1100/tsw.2004.183.
20. Ribatti D., Crivellato E. The role of mast cell in tissue morphogenesis. Thymus, duode-num, and mammary gland as examples. *Exp Cell Res.*, 2016, vol. 341(1), pp. 105–109. DOI: 10.1016/j.yexcr.2015.11.022.
21. Ribatti D. Hans Selye and his studies on the role of mast cells in calciphylaxis and calcergy. *Inflamm Res.*, 2019, vol. 68(2), pp. 177–180. DOI: 10.1007/s00011-018-1199-7.
22. Semenenko S.B., Karatieieva S.Y., Bakun O.V. et al. Peculiarities of the functioning circadian organization the ion-regulating function of kidney under the condition of pineal gland hyperfunction of the influence nitrogen monoxide synthesis blockade. *Wiad Lek.*, 2019, vol. 72(2), pp. 234–238.
23. Suzuki K., Kitami A., Okada M. et al. Evaluation of age-related thymic changes using computed tomography images: A retrospective observational study. *Medicine (Baltimore)*, 2022, vol. 101(32), e29950. DOI: 10.1097/MD.00000000000029950.
24. Tarocco A., Caroccia N., Morciano G. et al. Melatonin as a master regulator of cell death and inflammation: molecular mechanisms and clinical implications for newborn care. *Cell Death Dis.*, 2019, vol. 10(4), p. 317. DOI: 10.1038/s41419-019-1556-7.
25. Zhang X., Wang X., Yin H. et al. Functional Inactivation of Mast Cells Enhances Subcutaneous Adipose Tissue Browning in Mice. *Cell Rep.*, 2019, vol. 28(3), pp. 792–803.e4. DOI: 10.1016/j.celrep.2019.06.044.

ELENA M. LUZIKOVA – Candidate of Biological Sciences, Associate Professor, Department of General and Clinical Morphology and Forensic Medicine, Chuvash State University, Russia, Cheboksary (nema76@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1217-0985>).

VALENTINA E. SERGEEVA – Doctor of Biological, Professor, Department of Medical Biology with a Course of Microbiology and Virology, Chuvash State University, Russia, Cheboksary (valentina-sergeeva@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3471-5226>).

NATALIA E. GIMALDINOVA – Candidate of Medical Sciences, Associate Professor, Department of General and Clinical Morphology and Forensic Medicine, Chuvash State University, Russia, Cheboksary (nema76@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2475-3392>).

Формат цитирования: Лузикова Е.М., Сергеева В.Е., Гималдинова Н.Е. Исследование влияния светового режима и мелатонина на интенсивность инволюции тимуса крыс, опосредованную серотонинсодержащими тучными клетками [Электронный ресурс] // *Acta medica Eurasica*. – 2023. – № 2. – С. 60–72. – URL: <http://acta-medica-eurasica.ru/single/2023/2/7>. DOI: 10.47026/2413-4864-2023-2-60-72.