

© Коллектив авторов, 2022
УДК 611.018
DOI – <https://doi.org/10.14300/mnnc.2022.17017>
ISSN – 2073-8137

ВЛИЯНИЕ ФОТОПЕРИОДА И ЭКЗОГЕННОГО МЕЛАТОНИНА НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ И АПОПТОЗ ЛИМФОЦИТОВ СЕЛЕЗЕНКИ

Е. М. Лузикова, Л. В. Оганесян, О. А. Ефремова,
А. В. Московский, Д. О. Сумбаев, А. Р. Абузаров, В. Е. Сергеева

Чувашский государственный университет им. И. Н. Ульянова, Чебоксары,
Российская Федерация

THE EFFECT OF PHOTOPERIOD AND EXOGENOUS MELATONIN ON PROLIFERATION AND APOPTOSIS OF SPLEEN LYMPHOCYTES

Luzikova E. M., Oganessian L. V., Efremova O. A.,
Moskovskii A. V., Sumbaev D. O., Abuzarov A. R., Sergeeva V. E.

I. N. Ulyanov Chuvash State University, Cheboksary, Russian Federation

Было изучено действие мелатонина на пролиферацию (Ki-67⁺) и апоптоз (Caspasa-3⁺) клеток селезенки мышей, содержащихся в условиях естественного фотопериода и в условиях отсутствия фотопериода (при постоянном затемнении). Исследование показало, что процессы апоптоза и пролиферации являются фотозависимыми: стимуляция пролиферации и апоптоза лимфоцитов мелатонином возможна при естественном фотопериоде. Введение мелатонина при отсутствии фотопериода, напротив, снижает апоптоз и пролиферацию лимфоцитов и клеток стромы селезенки как в красной, так и в белой пульпе, что является проявлением адаптогенного действия мелатонина.

Ключевые слова: селезенка, мелатонин, фотопериод, пролиферация, апоптоз

The effect of melatonin on the proliferation (Ki-67⁺) and apoptosis (Caspasa-3⁺) of spleen cells of mice kept experimentally under natural photoperiod conditions and in the absence of photoperiod (with constant darkening) was studied. Our studies have shown that the processes of apoptosis and proliferation are photo dependent: stimulation of proliferation and apoptosis of lymphocytes by melatonin is possible with a natural photoperiod. The introduction of melatonin in the absence of a photoperiod, on the contrary, reduces apoptosis and proliferation of lymphocytes and cells of the spleen stroma both in the red and in the white pulp, which is a manifestation of the adaptogenic effect of melatonin.

Keywords: spleen, melatonin, photoperiod, proliferation, apoptosis

Для цитирования: Лузикова Е. М., Оганесян Л. В., Ефремова О. А., Московский А. В., Сумбаев Д. О., Абузаров А. Р., Сергеева В. Е. ВЛИЯНИЕ ФОТОПЕРИОДА И ЭКЗОГЕННОГО МЕЛАТОНИНА НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ И АПОПТОЗ ЛИМФОЦИТОВ СЕЛЕЗЕНКИ. *Медицинский вестник Северного Кавказа*. 2022;17(1):64-67.
DOI – <https://doi.org/10.14300/mnnc.2022.17017>

For citation: Luzikova E. M., Oganessian L. V., Efremova O. A., Moskovskii A. V., Sumbaev D. O., Abuzarov A. R., Sergeeva V. E. THE EFFECT OF PHOTOPERIOD AND EXOGENOUS MELATONIN ON PROLIFERATION AND APOPTOSIS OF SPLEEN LYMPHOCYTES. *Medical News of North Caucasus*. 2022;17(1):64-67. DOI – <https://doi.org/10.14300/mnnc.2022.17017> (In Russ.)

БП – белая пульпа
КП – красная пульпа

Ki-67 – ядерный белок, представляющий основную часть ядерного матрикса и экспрессируемый на всем протяжении митотического цикла, кроме G0-периода

Биологические процессы идут с разной степенью интенсивности днем и ночью, при этом свет является важнейшим синхронизирующим и адаптирующим внутреннее время «биологических часов» с внешними воздействиями фактором [1]. Основным посредником этих процессов в организме считается гормон мелатонин [2].

Ритмичность синтеза мелатонина шишковидной железой объясняет его хронобиологическое действие на организм, включая эндокринные и неэндокринные ритмы. Другие функции мелатонина, включая его антиоксидантные и противовоспалительные

свойства, его геномное действие и его способность модулировать митохондриальный гомеостаз связаны с окислительно-восстановительным статусом клеток и тканей [3, 4].

Нарушение циркадных ритмов влияет на развитие опухолей: мужчины, трудящиеся в ночные смены, чаще остальных становятся подвержены риску развития рака предстательной железы [5, 6], женщины – рака молочной железы [7, 8], что может быть связано с изменениями в специфическом звене антибластомной резистентности, поскольку показаны отличия в воздействии мелатонина на показатели клеточного

иммунитета при нормальном и непрерывном освещении [9–11]. Известно, что мелатонин подавляет Fas-опосредованную активацию каспазы-3 в лимфоцитах [12, 13] и стимулирует их возвращение в митотический цикл. Однако в изученной нами литературе мало исследований, посвященных влиянию сдвига фотопериода в темную часть на иммунные органы.

Цель исследования – изучить влияние экзогенного мелатонина на пролиферацию и апоптоз клеток селезенки мышей, содержащихся в разных условиях освещения.

Материал и методы. Работа выполнена на нелинейных лабораторных мышах (n=60) в возрасте трех недель и массой 8–9 г. Животные были разделены на 4 группы по 20 особей (табл.), содержащихся в разных условиях освещения с питьевым режимом, в состав которого входил (4 мг/л) либо не входил мелатонин.

Таблица

Условия проведения эксперимента

Показатель	Естественные условия освещения		Условия затемнения	
	Группы экспериментальных мышей			
	I	II	III	IV
Длительность, сутки	28	28	28	28
Количество животных	20	20	20	20
Продолжительность светового дня, ч	8–9	8–9	–	–
Освещенность утром, лк	50–150	50–150	0–0,5	0–0,5
Освещенность пасмурным днем, лк	до 500	до 500		
Освещенность ясным днем, лк	до 1000	до 1000		
Освещенность вечером, лк	100–200	100–200		
Концентрация мелатонина в воде, мг/л	0	4	0	4

Селезенка у животных извлекалась после удушающего действия диоксида углерода на 28-е сутки эксперимента во второй половине дня (15:00–17:00) и фиксировалась в 10 % формалине с последующей заливкой в парафин для общегистологических и иммунологических методов исследования. Для демаскировки антигенов: предметные стекла помещали в емкость с буферными растворами pH 6,0 или pH 9,0 (ЭДТА) на 20–25 минут при температуре 95 °С. Емкости со стеклами охлаждали в течение 20 минут до комнатной температуры, промывали дистиллированной водой в 2 смены по 5 минут. Срезы обрабатывали 3 % раствором перекиси водорода в течение 30 минут, промывали дистиллированной водой – 2 смены по 5 минут.

Для выявления клеток, находящихся в фазе исполнения апоптоза, срезы толщиной до 5 мкм подвергали иммуногистохимическому окрашиванию по стандартной методике с моноклональными антителами к каспазе-3 («Novocastra», разведение 1:100). Для иммуногистохимического выявления ядерного белка пролиферирующих клеток использовали непрямой метод связывания моноклональных антител мышей с антигеном Ki-67 (NCL-Ki67-MM1, 1:200, Novocastra). Для визуализации продуктов иммунной реакции использовали стрептавидин-биотиновый пероксидаз-

ный метод («Dako», LSAB+Kit, HRP, Дания), в качестве красящего соединения применяли раствор диаминобензидина («Dako», Liquid DAB+, Дания), докраска ядер осуществлялось гематоксилином. Подсчет клеток был произведен с использованием программы SigmaScan Pro5 (США) и микроскопа Carl Zeiss Axio Scope A1 (Германия) при увеличении 400. Выводы о содержании вещества в клетках делались путем измерения его оптической плотности в 100 клетках по каждому животному с помощью программы SigmaScan Pro5. Статистическая обработка производилась с использованием программы Statistica 17 (США).

Результаты и обсуждение. Установлено, что Ki-67-позитивные клетки – активно пролиферирующие клетки, в селезенке контрольных животных I группы располагаются в красной и белой пульпе. В лимфоидных узелках селезенки эти клетки встречаются единично. В КП процессы пролиферации идут активнее, что характеризует миелопоэз у мышевидных грызунов.

В условиях естественного фотопериода мелатонин увеличивает количество митотически делящихся (Ki-67-позитивных) клеток в КП в 5,2 раза (II группа) ($p \leq 0,001$) (рис. 1). Затемнение в течение 4 недель также увеличивает интенсивность пролиферации клеток стромы КП в 3,6 раза (III группа) ($p \leq 0,0001$). Вероятно, во II группе наблюдается синергизм действия экзогенного и эндогенного мелатонина (вырабатываемого в ночное время) [2, 4], поэтому пролиферирующих клеток больше в 1,5 раза, чем в III группе. Вместе с тем мелатонин, введенный животным, находившимся в условиях отсутствия фотопериода в течение 4 недель (IV группа), снижает количество пролиферирующих клеток в 8,4 раза по отношению к данным, полученным во II группе ($p \leq 0,005$).

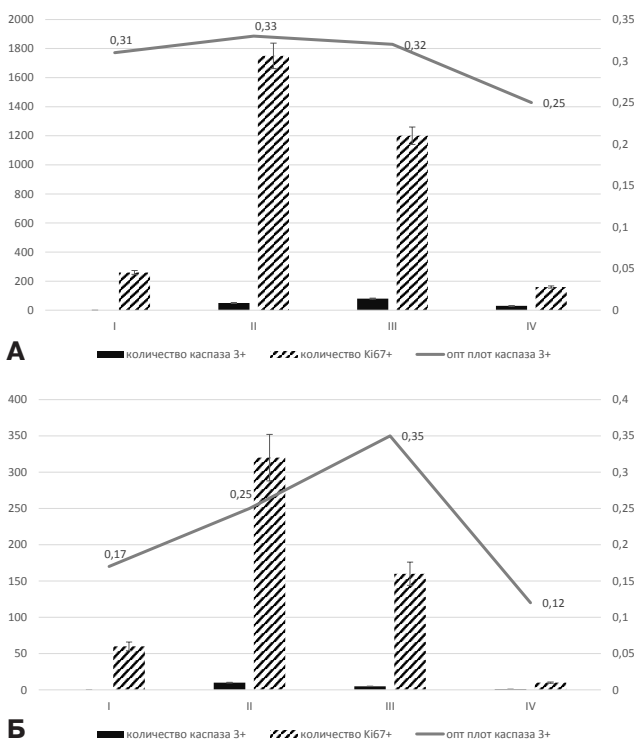


Рис. 1. Влияние фотопериода и мелатонина на Ki-67-позитивные и каспаза-3-позитивные клетки красной (А) и белой (Б) пульпы селезенки мышей разных экспериментальных групп: I – группа в условиях естественного фотопериода; II – группа в условиях естественного фотопериода с введением мелатонина; III – группа в условиях затемнения; IV – группа в условиях затемнения с введением мелатонина

В БП селезенки наблюдается аналогичная тенденция: количество Ki-67-позитивных клеток увеличивается в ответ на 4-недельное содержание в темноте (в 2,7 раза) ($p \leq 0,001$), в ответ на ежедневное введение мелатонина в условиях естественного фотопериода (в 5,2 раза) ($p \leq 0,001$) и снижается в ответ на ежедневное введение мелатонина животным, содержащимся в темноте (в 6 раз) ($p \leq 0,001$).

В результате проведенных исследований было установлено, что индексы пролиферативной активности как в КП ($65 \pm 8,3\%$), так и в БП ($45 \pm 5,6\%$; $p \leq 0,001$) селезенки мышей, содержащихся в естественных условиях освещения, достаточно высоки, что объясняется активными процессами миелопоэза и лимфопоэза в селезенке мышей. В условиях отсутствия фотопериода индекс пролиферативной активности не претерпевает значимых изменений в КП ($63 \pm 6,7\%$; $p \leq 0,0001$), но резко снижается в БП ($8 \pm 3\%$; $p \leq 0,0001$).

Мелатонин, вводимый в естественных условиях освещения, приводит к увеличению индекса пролиферативной активности в КП ($76 \pm 11\%$; $p \leq 0,001$), а при отсутствии фотопериода пролиферация мелатонином снижается и в КП, и в БП ($59 \pm 8\%$; $p \leq 0,001$, $5 \pm 1,5\%$; $p \leq 0,001$ соответственно).

Иммуноцитохимическая реакция на caspase-3 (L-18) проведена для выявления цитоплазматического белка, играющего важную роль в дифференцировке тканей, регенерации и развитии нервной системы. Каспаза-3 наиболее часто активируется при апоптозе, что позволяет использовать этот фермент как индикатор запрограммированной клеточной гибели.

В селезенке контрольных животных каспаза-3-позитивные клетки встречаются единично, однако отсутствие фотопериода вызывает увеличение количества этих клеток в 8 раз ($p \leq 0,001$). Мелатонин, введенный в таких условиях, оказал протективное действие, снизив количество исследуемых клеток в 2 раза, в то время как его добавление в условиях естественной смены дня и ночи привело к увеличению количества каспаза-3-позитивных клеток в 5 раз ($p \leq 0,0001$) (рис. 2).

Наиболее существенные изменения наблюдались в БП селезенки, где введение мелатонина в условиях

естественного фотопериода приводит к увеличению количества каспаза-3-позитивных клеток в 25 раз ($p \leq 0,005$). Введение мелатонина в отсутствие фотопериода не приводит к значимым изменениям количества каспаза-3-позитивных клеток, что коррелирует со снижением количества Ki-67-позитивных клеток (рис. 2).

Исходя из того, что мелатонин подавляет Fas-опосредованную активацию каспазы-3 в лимфоцитах [12, 13] и стимулирует их возвращение в митотический цикл, мы предполагали получить обратные корреляционные связи между количеством каспаза-3- и Ki-67-позитивных клеток в экспериментальных группах животных, получавших мелатонин. Однако нами выявлены сильные прямые корреляционные связи между количеством каспаза-3- и Ki-67-позитивных клеток селезенки во II и IV экспериментальных группах. Это можно объяснить созависимостью процессов апоптоза и пролиферации. Установлено, что апоптотические клетки в определенных условиях могут продуцировать и секретировать митогенные сигналы, а усиление скученности клеток на единицу площади индуцирует апоптотическую гибель клеток [14, 15].

Во II и III экспериментальных группах животных определено увеличение количества Ki-67-позитивных клеток по сравнению с I контрольной группой. Если активация пролиферации лимфоцитов и стромальных клеток во II экспериментальной группе объясняется влиянием экзогенного и эндогенного мелатонина, то аналогичная стимуляция, наблюдаемая в III группе, объясняется более длительным действием эндогенного мелатонина [2, 4]. Литературные данные об ингибирующем действии световой депривации на канцерогенез [16], вероятно, объясняются усиленным синтезом мелатонина и соотносятся с данными о способности мелатонина подавлять клеточную пролиферацию [17].

Неожиданные результаты мы получили в IV экспериментальной группе, где животные содержались в темноте и получали мелатонин: активность процессов пролиферации снижалась как в красной, так и в БП. Параллельно мы наблюдали снижение интенсивности апоптоза в лимфоидных узелках и стромах селезенки путем снижения экспрессии каспазы-3. Известно, что мелатонин модулирует пролиферацию посредством активации апоптоза и вовлечения важнейших, включая каспазозависимых, регуляторов клеточного цикла [13]. В нашем эксперименте темновые условия в течение 4 недель приводят к усилению экспрессии каспазы-3, но экзогенный мелатонин, введенный в темновых условиях, подавляет экспрессию каспазы-3, вероятно, посредством стимуляции экспрессии рецепторов мелатонина и/или механизмов без их вовлечения [18, 19].

Закключение. Исследования показали, что процессы апоптоза и пролиферации являются фотозависимыми – стимуляция пролиферации и апоптоза лимфоцитов мелатонином возможна при естественном фотопериоде. Введение мелатонина при отсутствии фотопериода, напротив, снижает апоптоз и пролиферацию лимфоцитов и клеток стромы селезенки как в красной, так и в белой пульпе, что является проявлением адаптогенного действия мелатонина.

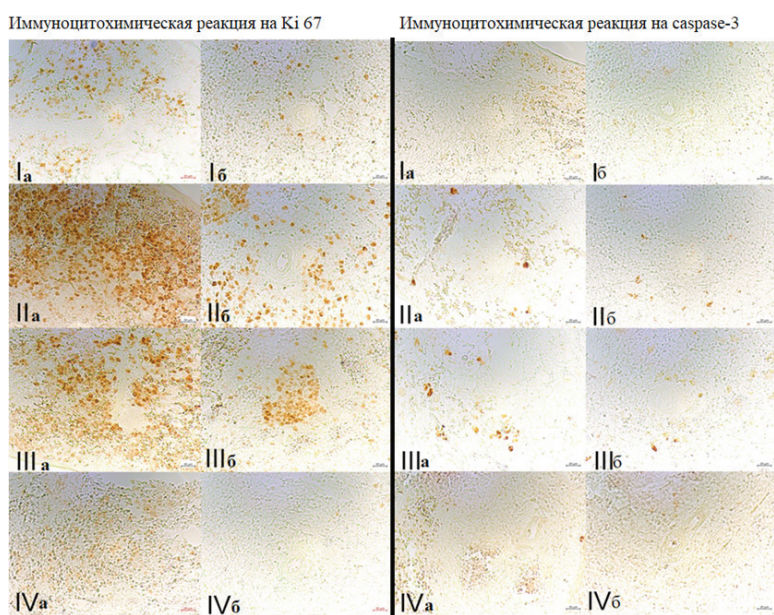


Рис. 2. Влияние экзогенного мелатонина на Ki-67- и каспаза-3-позитивные клетки КП (а) и БП (б) селезенки мышей разных экспериментальных групп (I – IV). Ув. $\times 400$

Информированное согласие. При проведении экспериментов соблюдались требования, сформулированные в Директивах Совета Европейского Сообщества (89/609/ЕЕС) об использовании животных для экспериментальных исследований, при наличии

положительного заключения этического комитета ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет им. И. Н. Ульянова» от 01.03.2013.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература/References

1. Duffy J. F., Wright K. P. Jr. Entrainment of the human circadian system by light. *J. Biol. Rhythms*. 2005;20(4):326-338. <https://doi.org/10.1177/0748730405277983>
2. Reiter R. J., Rosales-Corral S., Sharma R. Circadian disruption, melatonin rhythm perturbations and their contributions to chaotic physiology. *Adv. Med. Sci.* 2020;65(2):394-402. <https://doi.org/10.1016/j.advms.2020.07.001>
3. Arushanyan E., Shchetinin E. Pineal hormone melatonin as universal modulator of any pathological processes. *Medical News of North Caucasus*. 2014;9(2):187-198. <https://doi.org/10.14300/mnnc.2014.09054>
4. Reiter R. J., Tan D. X., Galano A. Melatonin: exceeding expectations. *Physiology*. 2014;29(5):325-333. <https://doi.org/10.1152/physiol.00011.2014>
5. Mancio J., Leal C., Ferreira M., Norton P., Lunet N. 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;21(3):337-344. <https://doi.org/10.1038/s41391-018-0040-2>
6. 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. *Am. J. Epidemiol.* 2019;188(10):1801-1811. <https://doi.org/10.1093/aje/kwz167>
7. Copertaro A., Bracci M. Working against the biological clock: a review for the Occupational Physician. *Ind. Health.* 2019;57(5):557-569. <https://doi.org/10.2486/indhealth.2018-0173>
8. Pham T. T., Lee E. S., Kong S. Y., Kim J., Kim S. Y. [et al.]. Night-shift work, circadian and melatonin pathway related genes and their interaction on breast cancer risk: evidence from a case-control study in Korean women. *Sci. Rep.* 2019;9(1):10982. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47480-2>
9. Litvinenko G. I., Shurygina A. V., Gritsyk O. B., Mel'nikova E. V., Tenditnik M. V. [et al.]. Effects of Melatonin on Morphological and Functional Parameters of the Pineal Gland and Organs of Immune System in Rats During Natural Light Cycle and Constant Illumination. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2015;159(1):62-65. <https://doi.org/10.1007/s10517-015-3061-z>
10. Markus R. P., Sousa K. S., da Silveira Cruz-Machado S., Fernandes P. A., Ferreira Z. S. Possible Role of Pineal and Extra-Pineal Melatonin in Surveillance, Immunity, and First-Line Defense. *Int. J. Mol. Sci.* 2021;22(22):12143. <https://doi.org/10.3390/ijms222212143>
11. Singh A., Singh R., Tripathi M. K. Photoperiodic manipulation modulates the innate and cell mediated immune functions in the fresh water snake, Natrix piscator. *Sci. Rep.* 2020;10(1):14722. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71777-2>
12. Sánchez-Bretaña A., Baba K., Janjua U., Piano I., Gargini C., Tosini G. Melatonin partially protects 661W cells from H(2)O(2)-induced death by inhibiting Fas/FasL-caspase-3. *Mol. Vis.* 2017;23:844-852.
13. Sharma S., Sarkar J., Haldar C., Sinha S. Melatonin Reverses Fas, E2F-1 and Endoplasmic Reticulum Stress Mediated Apoptosis and Dysregulation of Autophagy Induced by the Herbicide Atrazine in Murine Splenocytes. *PLoS One*. 2014;9(9):e108602. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108602>
14. Sun Y., Liu W. Z., Liu T., Feng X., Yang N., Zhou H. F. Signaling pathway of MAPK/ERK in cell proliferation, differentiation, migration, senescence and apoptosis. *J. Recept. Signal Transduct. Res.* 2015;35(6):600-604. <https://doi.org/10.3109/10799893.2015.1030412>
15. Маркова Е. В., Савкин И. В., Анисеева О. С., Козлов В. А. Пролиферация и апоптоз лимфоцитов у экспериментальных животных после многократной трансплантации клеток иммунной системы, проведенной в ювенильный период развития. *Бюллетень сибирской медицины*. 2019;18(2):119-126. [Markova E. V., Aniseeva O. S., Savkin I. V., Kozlov V. A. Proliferation and apoptosis of experimental animal's lymphocytes after multiple transplantation of immune cells from opposite behavioral types of donors carried out in the juvenile period. *Bulleten Sibirskoj Medicini*. – *Bulletin of Siberian Medicine*. 2019;18(2):119-126. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-2-119-126>
16. Giudice A., Crispo A., Grimaldi M., Polo A., Bimonte S. [et al.]. The Effect of Light Exposure at Night (LAN) on Carcinogenesis via Decreased Nocturnal Melatonin Synthesis. *Molecules*. 2018;23(6):1308. <https://doi.org/10.3390/molecules23061308>
17. Champney T. H., Prado J., Youngblood T., Appel K., McMurray D. N. Immune responsiveness of splenocytes after chronic daily melatonin administration in male Syrian hamsters. *Immunol. Lett.* 1997;58(2):95-100. [https://doi.org/10.1016/s0165-2478\(97\)00039-4](https://doi.org/10.1016/s0165-2478(97)00039-4)
18. Ahmad R., Haldar C. Photoperiodic regulation of MT1 and MT2 melatonin receptor expression in spleen and thymus of a tropical rodent *Funambulus pennanti* during reproductively active and inactive phases. *Chronobiol. Int.* 2010;27(3):446-462. <https://doi.org/10.3109/07420521003666408>
19. Estaras M., Peña F. J., Tapia J. A., Fernandez-Bermejo M., Mateos J. M. [et al.]. Melatonin modulates proliferation of pancreatic stellate cells through caspase-3 activation and changes in cyclin A and D expression. *J. Physiol. Biochem.* 2020;76(2):345-355. <https://doi.org/10.1007/s13105-020-00740-6>

Поступила 01.12.2020

Сведения об авторах:

Лузикова Елена Михайловна, кандидат биологических наук, доцент кафедры общей и клинической морфологии и судебной медицины; тел.: 892785307704; e-mail: nema76@mail.ru

Оганесян Леон Вазгенович, студент; тел.: 89530157841; e-mail: oganesovan@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0001-5331-3412>

Ефремова Ольга Александровна, кандидат медицинских наук, доцент кафедры; тел.: 89373739113; e-mail: oefremova13@rambler.ru

Московский Александр Владимирович, доктор медицинских наук, профессор кафедры ортопедической стоматологии и ортодонтии; тел.: 89093026795; e-mail: moskov_av@mail.ru

Сумбаев Дмитрий Олегович, студент; тел.: 89379538665; e-mail: dem0n21n4k@gmail.com

Абузаров Айрат Рафаилович, студент; тел.: 89274313697; e-mail: abuzarov.airat@mail.ru

Сергеева Валентина Ефремовна, доктор биологических наук, профессор кафедры медицинской биологии с курсом микробиологии и вирусологии; тел.: 89093016259; e-mail: valentina-sergeeva@yandex.ru