

ЗМІНИ СТАНУ ЗАПАЛЕННЯ БІЛОЇ ЖИРОВОЇ ТКАНИНИ ЩУРІВ ЗА УМОВ РОЗВИТКУ ОЖИРІННЯ ПРИ РІЗНИХ РЕЖИМАХ ВВЕДЕННЯ МЕЛАТОНІНУ

О.О. КАЛМИКОВА, А.В. ЮРЧЕНКО, О.М. САВЧУК, М.Е. ДЗЕРЖИНСЬКИЙ

Навчально-науковий центр «Інститут біології та медицини»
Київського національного університету імені Тараса Шевченка
01601, м. Київ, вул. Володимирська 64/13.
E-mail: olesiakalmukova28@gmail.com

Досліджено впливи різних режимів (ранкового та вечірнього) введення мелатоніну (30 мг/кг/добу впродовж 7 тижнів) на перебіг запального процесу в вісцеральній білій жировій тканині (наявність макрофагів, що утворюють структури подібні до «корони» навколо адипоцитів; рівень фіброзу та кількість тучних клітин в білій жировій тканині; вміст прозапальних (ІЛ-1 β , ІЛ-8, фактор некрозу пухлин α , інтерферон γ) та протизапальних (ІЛ-4, ІЛ-10) цитокінів в сироватці крові) за умов розвитку висококалорійного ожиріння у щурів. Після застосування мелатоніну спостерігали зменшення кількості макрофагів та тучних клітин в білій жировій тканині у щурів з ожирінням, а також було показано зниження вмісту колагенових волокон (фіброзу) та площі адипоцитів. Вечірні введення мелатоніну (за годину до вимкнення світла) продемонстрували більшу ефективність в порівнянні з ранковими (за годину після ввімкнення світла). Крім того, в сироватці щурів з ожирінням при введенні мелатоніну зростає рівень протизапальних цитокінів, в той час як прозапальних - навпаки знижувався. Це вказує на прояв протизапальних властивостей мелатоніну за умов розвитку ожиріння та є теоретичною передумовою для подальшого розгляду на можливість його використання в терапії ожиріння.

Ключові слова: висококалорійне ожиріння, запалення, хронобіологія, мелатонін, цитокіни, фіброз, тучні клітини, адипоцити.

Вступ. Однією з можливих причин ожиріння є розвиток запалення [1]. Жирова тканина секретує ряд гормонів та адипокінів (лептин, резистин, адипонектин та інші) в кров, в тому числі і прозапальних цитокінів [2], які в свою чергу впливають на тканинно-резидентних макрофагів, поляризуючи їх в прозапальний бік (M1 тип), чим і запускається приваблення макрофагів та інших імунних клітин (наприклад, тучних клітин) з судин до жирової тканини [3, 4]. Біля 90 % всіх макрофагів жирової

тканини при ожирінні зосереджуються навколо мертвих адипоцитів, формуючи структури подібні до «корони» (СПК) [5, 6], які є морфологічними маркерами хронічного запалення. Також при ожирінні стрімко зростає як розмір окремих адипоцитів (гіпертрофія), так і їх кількість (гіперплазія), що веде до гіпоксії паренхіми жирової тканини та, як наслідок, продукування гіпоксіє-індуцибельного фактору, що стимулює розвиток фіброзу [7].

Одними серед ключових факторів регуляції поляризації макрофагів, на рівні з адипоцитами, виступають тучні клітини [8]. Показане зростання їх кількості в вісцеральній білій жировій тканині за умов розвитку ожиріння [9]. Тучні клітини залучені в підтримці хронічного запалення через підвищену експресію молекул адгезії, впливу на проникність судин, полегшення рекрутування лейкоцитів з кровотоку за допомогою вивільнення цитокінів [10], стимулювання фібробластів до синтезу колагену V типу з подальшим розвитком фіброзу жирової тканини [11].

Мелатонін (N-ацетил-5-метокситриптамін) – гормон епіфізу, окрім вираженої функції синхронізації циркадної ритміки організму виконує ще ряд деяких задач, включаючи антиоксидантну, імуномодуляторну, регуляції метаболізму та сезонного розмноження [12]. Рецептори до мелатоніну були знайдені на багатьох клітинах нашого організму, в тому числі на адипоцитах та імунних клітинах [13]. Мелатонін опосередковує свою дію через 3 типи мембранних рецепторів, 2 з них пов'язані з G-білками, та один являє собою цитозольний фермент хінонову редуктазу; а також через один ядерний – рецептор (транскрипційний фактор) суперродини ретиноївої кислоти [14]. Окрім активації відповідних рецепторів, мелатонін та його метаболіти (циклічний гідроксимелатонін,

N-ацетил-N-форміл-метоксикінурамін, N-ацетил-метоксикінурамін) безпосередньо виступають захоплювачами вільних радикалів в цитозолі [15]. Мелатонін може бути корисний при терапії ожиріння для нормалізації стану запалення в якості імуномодулятора, оскільки показаний його вплив на функції (фагоцитоз, стимуляція/інгібування синтезу цитокінів, розмноження, міграцію) макрофагів, нейтрофілів, моноцитів, тучних та інших клітин імунної системи [16, 17].

Окремим цікавим питанням є різна чутливість організму до мелатоніну впродовж доби, що проявляється відмінностями представлення його рецепторів (як мембранних, так і ядерних) різними клітинами [18–20]. Одним з актуальних питань хронофармакології є вибір ефективного часу введення препарату для збільшення корисного результату та зменшення побічної дії [21–23]. В нашому дослідженні ми обрали три режими введення мелатоніну:

- ранковий – для продовження нічного піку високої концентрації мелатоніну в крові;
- вечірній – для підсилення ефекту нічного піку секреції ендogenous мелатоніну;
- постійний прийом з питною водою – для тривалої активації рецепторів до мелатоніну на різних типах клітин.

З огляду на вищезазначене, метою нашої роботи було дослідити морфо-функціональні зміни запалення в вісцеральній білій жировій тканині щурів за умов розвитку ожиріння, індукованого висококалорійною дієтою, при різних режимах (ранковий, вечірній та постійний з питною водою) введення мелатоніну.

Матеріали та методи. *Моделювання ожиріння.* Досліди проводили на білих нелінійних щурах-самцях з початковою масою 100–120 г, які утримувались за стандартних умов віварію з вільним доступом до води та їжі по 5 тварин у клітці, та постійним температурним режимом. Як зовнішній синхронізатор часу використовували штучне освітлення. Добовий ритм (Zeitgeber time – ZT) складався з 12 год світла та 12 год темряви з ввімкненням світла о 7 годранку (ZT00) та вимкненням о 19:00 (ZT12).

Упродовж першого тижня всі щури отримували стандартну їжу «Purina rodent chow» і воду ad libitum. На 8-й день тварини рандомізовано були розділені на 2 групи: контрольні – знаходились на стандартному раціоні (3,81 ккал/г) та група з висококалорійною дієтою (ВКД, 5,35 ккал/г) – отримували висококалорійний корм, який складався із стандартної їжі (60 %), свинячого жиру (10 %), курячих яєць (10 %), сахарози (9 %), арахісу (5 %), сухого молока (5 %) та рослинної олії (1 %) [24, 25]. Тварин зважували один раз на тиждень. Для підтвердження розвитку ожиріння розраховували приріст маси тіла. Коли достовірна різниця цього показника між двома групами становила 30 %, тварин в кожній групі рандомізовано поділили на 4 групи відповідно до обраних режимів введення мелатоніну, тобто загалом було 8 дослідних груп (таблиця). Тварини продовжували споживати ВКД і після підтвердження розвитку ожиріння та під час застосування мелатоніну.

Підрахунок споживання води та корму проводили щодня о 10:00 та обчислювали відносне денне споживання води (мл/день/кг маси тіла)

Характеристика експериментальних груп

Назва груп	Тип дієти	режим введення меланіну
Контроль (К)	Стандартний	–
Мелатонін (М) вода	Стандартний	Постійний прийом з питною водою
М ZT01	Стандартний	За 1 год після ввімкнення світла (ранковий)
М ZT11	Стандартний	За 1 год до вимкнення світла (вечірній)
Ожиріння (ВКД)	Висококалорійна дієта	–
ВКД вода	Висококалорійна дієта	Постійний прийом з питною водою
ВКД ZT01	Висококалорійна дієта	За 1 год після ввімкнення світла (ранковий)
ВКД ZT11	Висококалорійна дієта	За 1 год до вимкнення світла (вечірній)

та корму (ккал/день/кг маси тіла) для кожної тварини. Масу тіла вимірювали 1 раз на тиждень та підраховували приріст маси тіла.

Введення мелатоніну. Мелатонін («Alcon Biosciences», США) вводили щоденно (30 мг/кг) у розчиненому вигляді в питній воді впродовж 7 тижнів в трьох режимах (рис. 1): перорально в 2 мл води через зонд (групи М ZT01, М ZT11, ВКД ZT01, ВКД ZT11) в ранковий час – за 1 год після ввімкнення світла (ZT01), або вечірній – за 1 год до вимкнення світла (ZT11); або ж постійний прийом з питною водою (необхідну дозу розчиняли у 25–30 мл згідно з проведеним розрахунком добового середнього значення об'єму споживання питної води на кожну тварину [26]). Введення мелатоніну було розпочато на 6-му тижні експерименту після підтвердження розвитку ожиріння.

Отримання біологічного матеріалу. В останній день експерименту тварин декапітували, після чого забирали кров для отримання сироватки та всю вісцеральну білу жирову тканину з гонадальних, навколонирикових, мезентеріальних регіонів і задньої стінки брюшної порожнини (заочеревинно) для подальшої обробки: зваження, частину відібраного матеріалу використали для біохімічного аналізу на визначення вмісту цитокінів, а іншу частину – для гістологічного дослідження.

Гістологічне дослідження. Фрагменти білої жирової тканини з задньої стінки брюшної порожнини розміром 1см × 1см фіксували в 4%-ному розчині параформальдегіду на 0,1 М фосфатному буфері протягом 72 годин, після чого зневоднювали та заливали в парафін за загальноприйнятою методикою [27]. З парафінових блоків виготовляли зрізи товщиною 5 мкм, які потім фарбували гематоксиліном Бемера та еозином.

Гістохімічний аналіз фіброзу білої жирової тканини. Виявлення колагенових волокон проводили за допомогою гістохімічного трихромного забарвлення за Ван Гізоном з дозабарвленням ядер клітин гематоксиліном Бемера [28]. Для кількісного визначення мікрофотографії виготовляли за допомогою об'єктива з кратністю збільшення 4, для кожної наступної мікрофотографії поле зору переміщували вправо, зберігаючи 20 % попереднього поля, доки не було відфотографовано весь зріз. Для створення

одного великого композитного зображення використовувався алгоритм зшивання програмного забезпечення Adobe Photoshop CS6 («Adobe Systems», США, серійний номер 1085). З кожного зображення розраховували площу забарвленої ділянки і виражали у відсотках від загальної площі [29].

Аналіз тучних клітин в білій жировій тканині. Тучні клітини виявляли цитохімічним забарвленням в 0,1% водному розчині толуїдинового синього [30].

Подальше дослідження препаратів проводили за допомогою світлового мікроскопа Olympus VX41 (Японія). Мікрофотографії отримували з використанням цифрової камери Olympus DP20 (Японія) та програмного забезпечення QucikPHOTO MICRO (*Promicra*, Чехія). Площу поперечного перерізу адипоцитів, рівень фіброзу тканини (площу, яку займають колагенові волокна) та кількість тучних клітин в полі зору мікроскопа вимірювали з використанням програми ImageJ (National Institutes of Health, США).

Визначення цитокінового профілю у сироватці крові щурів. Здійснювали за допомогою методу імуноферментного аналізу, який проводили у 96-лункових мікропланшетах з сорбційною здатністю для розчинних білків [31]. Сироватку попередньо розводили в десять разів 50 мМ Трис (гідроксиметил-амінометан)-HCl буфером (pH 7,4), який містив 150 мМ NaCl. Зразки в об'ємі 100 мкл інкубували в лунках мікропланшета при 4 °С протягом ночі. Після інкубації для видалення незв'язаного матеріалу лунки промивали буфером такого складу: 50 мМ Трис-HCl буфер (pH 7,4) з 150 мМ NaCl та 0,05 % Твін-20. Блокування неспецифічних місць зв'язування здійснювали шляхом інкубації з 5%-ним розчином знежиреного молока при 37 °С впродовж 1 год. Після промивання в окремі лунки мікропланшета вносили первинні моноклональні анти-IFN- γ бичачі антитіла, анти-IL-1 β бичачі антитіла, анти-IL-4 мишині антитіла, анти-IL-8 мишині, анти-ФНП α бичачі, анти-резістін бичачі, анти-IL-10 мишині антитіла («Santa Cruz Biotechnology», США). Інкубація тривала при 37 °С протягом 1 год. По закінченню часу інкубації, лунки мікропланшета промивали та вносили до них відповідні вторинні анти-кролячі, анти-

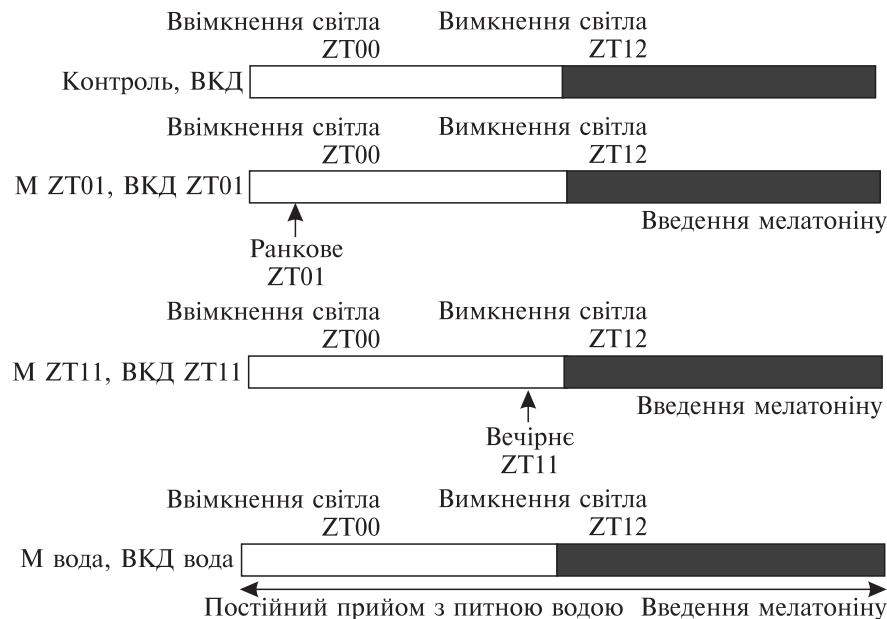


Рис. 1. Схематичний протокол 3-х режимів введення мелатоніну по групах

мишині, анти-бічачі антитіла («Santa Cruz Biotechnology», США), кон'юговані з пероксидазою хрому та інкубували при 37 °С протягом 1 год. Візуалізацію зв'язування вторинних антитіл проводили шляхом додавання в лунки 100 мкл розчину діамінобензидину в концентрації 0,4 мг/мл, приготованому на цитратному буфері (рН 5,0) з вмістом 0,013 % H_2O_2 . Пероксидазну реакцію зупиняли через 10 хв шляхом додавання 100 мкл 1М H_2SO_4 . Оптичну щільність вимірювали при 492 нм. Вміст цитокінів виражали в ум.од. у перерахунку на вміст загального білка в сироватці крові, який визначали методом Бредфорд [32]. Вміст цитокінів виражали у відсотках від значення контролю, яке приймали за 100 %.

Статистичний аналіз даних проводили за допомогою програмного забезпечення Statistica 6.0 (StatSoft, США) та Microsoft Excel 2010 (Microsoft, США). Характер розподілу числових значень оцінювали з використанням W-критерія Шапіро-Уїлка. Для оцінки достовірності виявлених змін застосовували параметричні (t-критерій Стьюдента, двох-вибірковий t-тест з поправкою Бонферонні) та непараметричні (U-критерій Манна-Уїтні для порівняння незалежних груп) методів варіативної статистики. Достовірними вважали відмінності

при ймовірності нульової гіпотези $P \leq 0,05$. Отримані результати представлені у вигляді середнього значення \pm стандартної похибки середнього.

Результати і обговорення. Адипоцити білої жирової тканини мають округлу морфологію, центрально розташовану одну велику ліпідну краплю та сплющене овальне ядро, розміщене периферично (рис. 2, а). Під час гістологічної обробки триацилгліцериди екстрагуються спиртами, а місце ліпідної краплі залишається незабарвленим гідрофільними барвниками. В нашій моделі розвитку ожиріння за умови споживання ВКД збільшується присутність макрофагів, які оточують гіпертрофовані адипоцити у стані апоптозу та утворюють структури подібні до «корони» (СПК), що є морфо-функціональною ознакою розвитку запалення в жировій тканині [33] (рис. 2, б). Після застосування мелатоніну у шурів, які отримували ВКД (групи ВКД вода (рис. 2, в), ВКД ZT01 та ВКД ZT11) спостерігали значне зменшення кількості СПК. Тобто, на зрізах жирової тканини груп ВКД ZT01 та ВКД ZT11 було зафіксовано також наявність СПК, проте СПК зустрічали рідко в порівнянні з групою ВКД. Цікаво, що у всіх трьох групах (М вода (рис. 2, в), М ZT01 та М ZT11), які споживали стандартний раціон

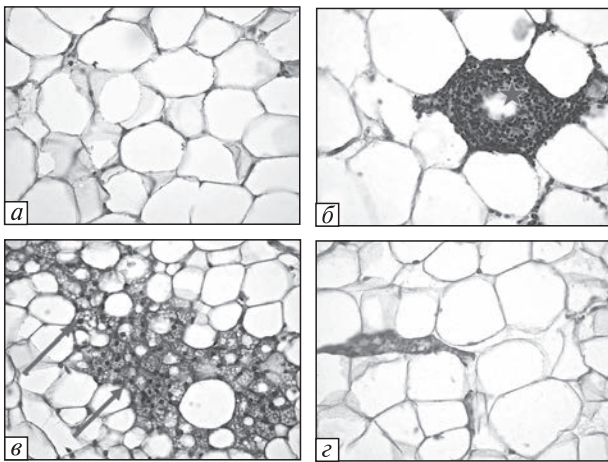


Рис. 2. Мікрофотографії зрізів білої жирової тканини шурів: *a* – контроль; *b* – група ВКД, зірочкою позначена структура подібна до «корони» – мертві адипоцити, оточені макрофагами; *v* – група М вода, стрілкою позначені бежеві адипоцити; *z* – група ВКД вода; забарвлення гематоксилін-еозин; ок. $\times 10$, об. $\times 40$

та одержували мелатонін, також були відмічені зміни в жировій тканині – зафіксовано появу бежевих адипоцитів. Бежеві адипоцити – третій тип адипоцитів після білих та бурих, які за морфологією (багато ліпідних крапель та мітохондрій навколо центрально розташованого округлого ядра) та функціями (телопродукції) схожі на бурих, проте локалізуються в білій жировій тканині [34]. Бежеві адипоцити можуть грати певну роль в терапії ожиріння, оскільки через активацію їх теплопродукуючої функції витрачається запас триацилгліцеридів та знижується маса накопиченої білої жирової тканини [35]. Осередки (проте меншого розміру) бежевих адипоцитів також були відмічені і в групах ВКД ZT11 та ВКД вода.

Споживання ВКД призводить до помітних змін в морфо-функціональному стані білої жирової тканини – площа адипоцитів зростає в 2 рази в порівнянні з контрольною групою (рис. 3).

Проте після застосування мелатоніну у всіх трьох групах незалежно від режиму прийому площа адипоцитів достовірно зменшується: у ВКД вода та ВКД ZT11 в 2 рази, а в ВКД ZT01 в 1,5 рази в порівнянні з групою ВКД. Вечірнє введення мелатоніну та прийом мелатоніну з питною водою зменшує площу адипоцитів до

контрольного рівня, ранкові введення не досягають його (площа більше на 45 % в порівнянні з контролем). Виявлена різниця режимах введення: за умов ранкового прийому площа адипоцитів залишається більшою на 30 % в порівнянні з ВКД ZT11 і ВКД вода. Введення мелатоніну за умов споживання стандартного корму спричиняє незначне зменшення площі адипоцитів (М вода – на 12 %, М ZT01 – на 20 % і М ZT11 – на 37 % в порівнянні з контрольною групою), що свідчить про активацію процесів ліполізу [36]. За умов розвитку ожиріння у жировій тканині спостерігається гіпертрофія адипоцитів, що веде не тільки до надмірної секреції адипоцитами прозапальних цитокінів та розвитку запалення, але ще й окрім цього призводить до інсулінорезистентності через порушення внутрішньоклітинних сигнальних шляхів інсулінових рецепторів в адипоцитах [37]. Резистин – один з адипокінів, який задіяний в регуляції чутливості до інсуліну жирової тканини. Його надмірна експресія в жировій тканині індукує розвиток інсулінорезистентності [38]. Також, він є один із факторів, який рекрутує «хоумінг» макрофагів в жировій тканині при метаболічному синдромі [39]. В нашій моделі розвитку ожиріння (рис. 3) у групі ВКД резистин в сироватці крові шурів перевищував контрольні показники на 30 %, а після застосування мелатоніну знижувався на 30 % у ВКД вода, на 13 % у ВКД ZT01, на 22 % у ВКД ZT11 в порівнянні з групою ВКД та досягали показників контрольної групи. Введення мелатоніну не впливали на рівень резистину у сироватці шурів, що перебували на стандартному раціоні харчування (групи М вода, М ZT01 та М ZT11).

При дисфункції жирової тканини через гіпертрофію розвивається гіпоксія, що веде за собою розвиток фіброзу [40]. Споживання ВКД (рис. 4, *b*) призводить до відкладання майже навколо кожної клітини колагенових волокон та розростання в тканині сполучнотканинних міжчасточкових септ, що забезпечує ригідність та жорсткість паренхіми жирової тканини; в той час як у контрольних шурів колагенові волокна локалізуються тільки в області септ (рис. 4, *a*). За умови введення мелатоніну у всіх трьох групах, які перебували на висококалорійній дієті – ВКД вода (рис. 4, *z*), ВКД ZT01 і ВКД

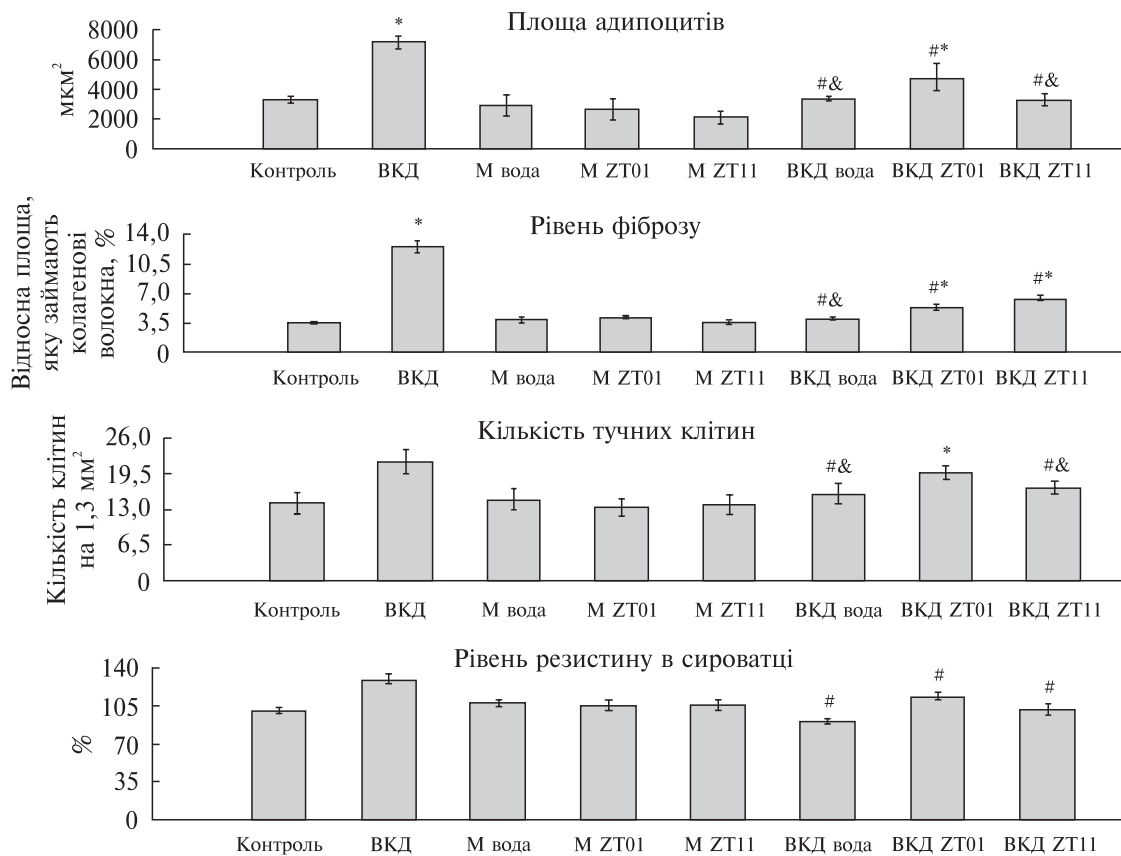


Рис. 3. Морфометричні дані аналізу площі адипоцитів, фіброзу, кількості тучних клітин в вісцеральній білій жировій тканині та рівня резистину в сироватці щурів; * – достовірна різниця між контрольною та дослідними групами, $p \leq 0,05$; # – достовірна різниця між групою ВКД та групами ВКД ZT01, ВКД ZT11 та ВКД вода, $p \leq 0,05$; & – достовірна різниця між групою ВКД ZT01 та групами ВКД ZT11 і ВКД вода, $p \leq 0,05$

ZT11 помітним стає зменшення депонування колагенових волокон в області септ, а також і навколо адипоцитів, як показав морфометричний аналіз (рис. 3). У групах, що отримували стандартний раціон харчування та введення мелатоніну, М вода, М ZT01 та М ZT11 значних змін в відкладенні колагенових волокон не було відзначено; натомість добре помітними були осередки диференціації бежевих адипоцитів (рис. 4, в).

У групі ВКД (рис. 3) збільшується відносна площа, яку займають колагенові волокна у 3,5 рази по відношенню до контрольної групи, що є маркером розвитку фіброзу тканини. А при використанні мелатоніну синтез та відкладення колагенових волокон під час розвитку ожиріння призупиняється: в порівнянні з групою ВКД у ВКД вода рівень фіброзу менший в 3 рази, у

ВКД ZT01 – в 2,4 рази, у ВКД ZT11 – в 2 рази. Найбільш ефективним режимом тут виявився прийом мелатоніну з питною водою: забезпечив менший розвиток фіброзу на 25 і 37 % по відношенню до ВКД ZT01 і ВКД ZT11 відповідно. Введення мелатоніну щурам зі стандартним раціоном харчування не впливає на розвиток фіброзу жирової тканини та збільшення колагенових волокон.

Ще одним маркером перебігу запального процесу в жировій тканині є присутність тучних клітин. Вони знаходяться навколо кровонесних судин та в ділянках сполучнотканинних септ (рис. 5, а). Проте за умов ВКД (рис. 5, б) їх присутність в стані активної секреції (частково дегранульованому) зростає в паренхімі жирової тканини, причому вони навіть можуть брати участь у формуванні СПК.

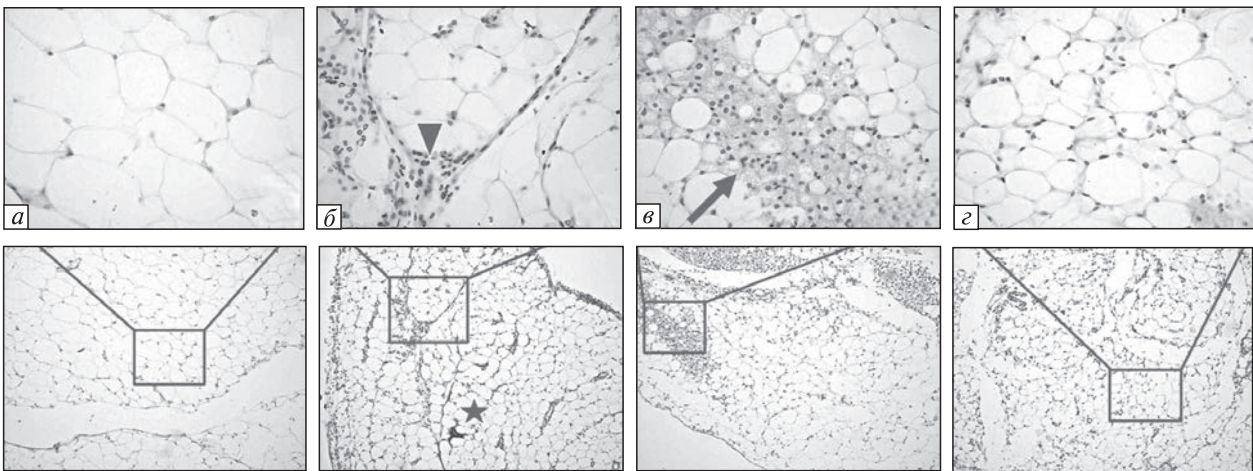


Рис. 4. Мікрофотографії гістохімічного трихромного виявлення фіброзу вісцеральної білої жирової тканини: *a* – контроль; *б* – група ВКД, зірочкою позначена структура подібна до «корони» – мертві адипоцити, оточені макрофагами; трикутник вказує на область розростання сполучнотканинної септи; *в* – група М вода, стрілкою позначені бежеві адипоцити; *г* – група ВКД вода; забарвлення за Ван Гізоном, з дофарбуванням ядер гематоксилином Бемера; ок. $\times 10$, об. $\times 10$, об. $\times 40$

Споживання ВКД приводить до збільшення (рис. 3) тучних клітин 1,6 разів по відношенню до контрольної групи, натомість за дії мелатоніну відбувається достовірне зменшення тучних клітин у ВКД вода у 1,4 рази та у ВКД ZT11 у 1,3 рази по відношенню до ВКД. Проте у ВКД ZT01 достовірних змін виявлено не було в порівнянні з ВКД (ріст по відношенню до контрольної групи складає у 1,4 рази). Введення мелатоніну шурам без ВКД (групи М вода, М ZT01 та М ZT11) не спричиняє збільшення кількості тучних клітин.

За умови розвитку індукованого дієтою ожиріння рівень досліджуваних прозапальних цитокінів (рис. 6) зростає на 22 % ІЛ-1 β та ФНП α , на 34 % ІЛ-8, на 50 % ІНФ γ . Введення мелатоніну в більшості випадків (окрім ІНФ γ) нормалізує рівень прозапальних цитокінів (ІЛ-1 β , ІЛ-8, ФНП α), знижуючи (по відношенню до групи ВКД) їх показники до контрольних. Проте постійний прийом мелатоніну з питною водою призвів до зниження рівня зазначених цитокінів нижче за контрольні показники ІЛ-1 β на 12 %, ІЛ-8 на 14 %, ФНП α на 16 %; але значення ІНФ γ не відрізнялось від контрольного. Напротивагу цьому, у групах ВКД ZT01 і ВКД ZT11 рівень ІНФ γ залишається вищим за групу контрольну на 36 і 26 % відповідно, причому у групах М вода, М ZT01 та М ZT11

спостерігається достовірне підвищення цього параметра на 24, 15, 41 % на фоні незмінного рівня інших цитокінів. Окрім функції прозапального цитокіну, ФНП α ще є маркером початку фіброзу [41]. Отримані зміни рівня ФНП α в сироватці шурів збігаються з результатами гістохімічного аналізу на фіброз та показують його зниження при застосуванні мелатоніну.

Значення протизапальних цитокінів у групі ВКД знижується: ІЛ-4 на 27 % та ІЛ-10 на 29 % в порівнянні з контролем. Введення мелатоніну не призводило до зростання ІЛ-4 (в порівнянні з контролем у групах ВКД вода, ВКД ZT01 та ВКД ZT11 показник залишався меншим на 35, 30 і 20 %, відповідно), однак рівень ІЛ-10 у групах ВКД ZT01 та ВКД ZT11 досягав контрольних значень, збільшуючись в порівнянні з ВКД на 30% і 34%. Цікаво, що мелатонін зменшував рівень ІЛ-4 у шурів із стандартною дієтою у М вода, М ZT01 та М ZT11 на 16, 18 і 20 %; і не впливав на значення ІЛ-10. Загалом, така зміна цитокінового профілю [42] після застосування мелатоніну свідчить про зменшення стану запалення в білій жировій тканині.

Такий ефект мелатоніну може бути опосередкований через активацію мелатонінових рецепторів на імунних клітинах та самих адипоцитах [43]. У ряді експериментів за інших

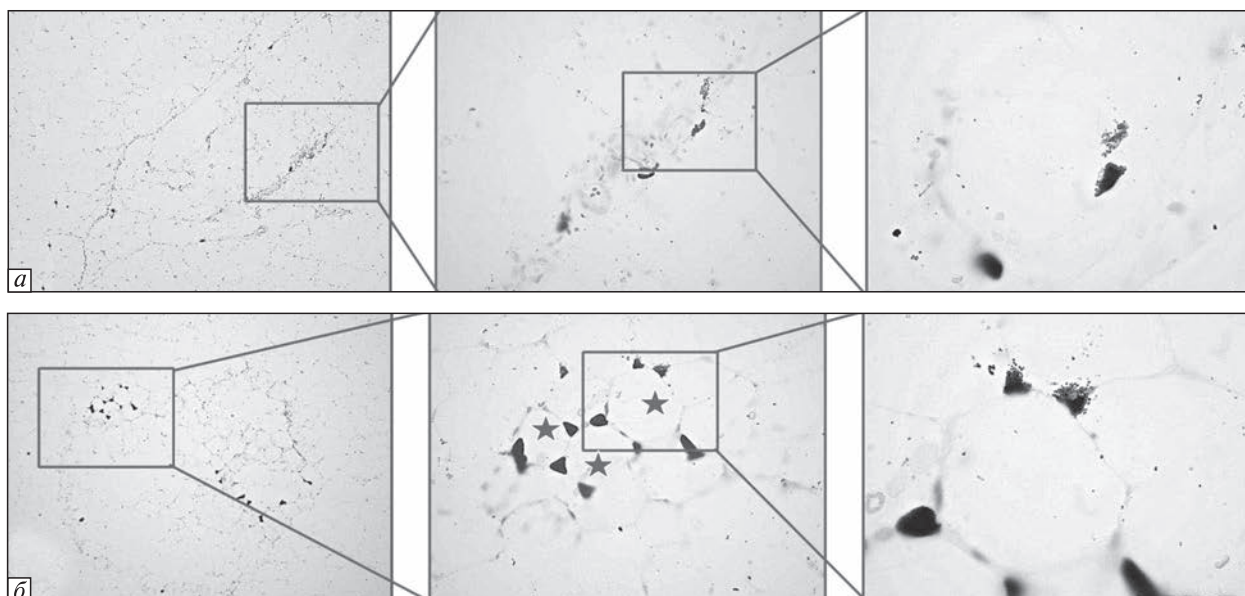


Рис. 5. Мікрофотографія цитохімічного виявлення тучних клітин в вісцеральній білій жировій тканині, *a* – контроль; *б* – група ВКД, зірочкою позначена структура подібна до «корони» – мертві адипоцити, оточені макрофагами; забарвлення толуїдиновим синім, ок. $\times 10$, об. $\times 10$, об. $\times 40$, об. $\times 100$

доз мелатоніну (2,3 мг/кг впродовж 10 тижнів з питною водою) були отримані схожі результати з цитокіновим профілем, проте дані щодо ІЛ-4 та ІНФ γ є відмінними [44]. Це може бути пов'язано з більшою дозою та іншими піддослідними тваринами. Дослідження на людях, які страждають на ожиріння, також показали позитивний ефект на рівень ФНП α в сироватці за умов низькокалорійної дієти та 6 мг мелатоніну за 2 години до сну через 40 днів прийому [45]. На генетично модифікованій лінії щурів з ожирінням, що веде до розвитку діабету (лінія Zucker), є підтвердження про зниження запалення (показаний ФНП α) та оксидативного стресу при умові споживання мелатоніну з питною водою протягом 6 тижнів в дозі 10 мг/кг [46]. Також були проведені дослідження з використанням більших доз мелатоніну (100 мг/кг/день постійно з питною водою протягом 8 тижнів) на мишах з генетично обумовленим дефіцитом лептину (лінія ob/ob), в яких показано зниження рівня прозапального адипокінового профілю (а саме, ФНП α , резистину, вісфатину) та підвищення рівня протизапального (адипонектину та його рецепторів) у вісцеральній та підшкірній жировій тканині по відношенню до

мишей з ожирінням (але значення були відмінними від контрольних) [47], проте були відсутні дані по ІЛ-4 та ІНФ γ . Зниження ІЛ-4 в сироватці щурів зі стандартним раціоном харчування може бути пов'язане з інгібуванням рецепторів TLR (toll-like receptor) M2-поляризованих макрофагів введенням мелатоніну [48, 49], оскільки мелатонін проявляє не тільки протизапальні властивості, а має імуномодулюючу дію (тобто може проявляти протилежні ефекти в залежності від стану про- або проти-запального) [50]. Хронофармакологічний ефект спостерігається при вечірньому введенні мелатоніну щурам зі стандартною дієтою на вивільнення ІНФ γ , можливо опосередковується через взаємодію з регулюючим фактором інтерферону 2 саме в даний час доби [51]. Така реакція на мелатонін зафіксована у моноцитах, макрофагах, спленоцитах, Т-лімфоцитах хелперах по всьому організму в цілому [52]. Проте для пояснення детальних механізмів потрібні подальші дослідження.

Висновки. Дія мелатоніну за умов розвитку ожиріння проявляється у зменшенні прозапального стану білої жирової тканини за рахунок зменшення фіброзу та кількості туч-

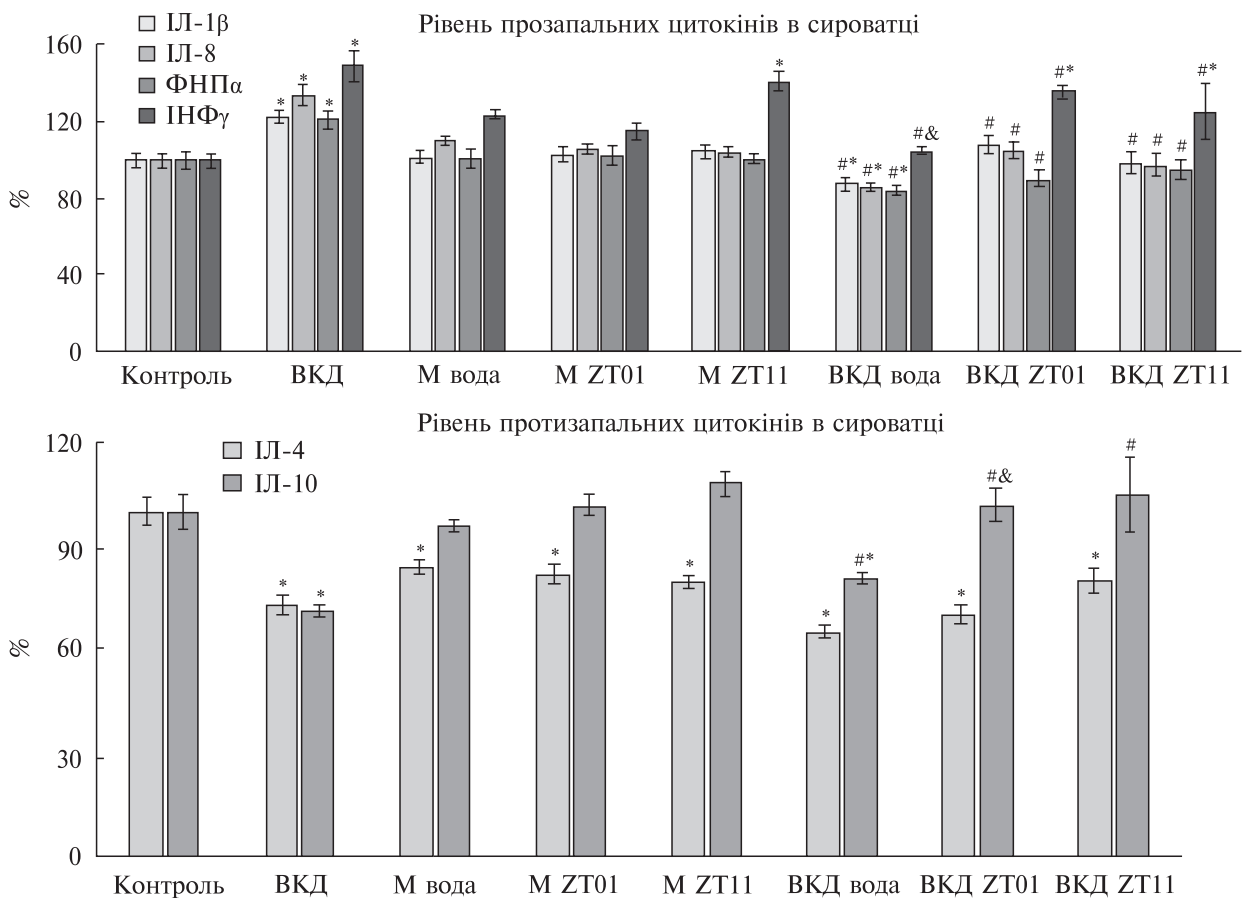


Рис. 6. Рівень прозапальних (ІЛ-1β, ІЛ-8, ФНПа, ИНФγ) та протизапальних (ІЛ-4, ІЛ-10) цитокінів у сироватці щурів. * – достовірна різниця між контрольною та дослідними групами, $p \leq 0,05$; # – достовірна різниця між групою ВКД та групами ВКД ZT01, ВКД ZT11 та ВКД вода, $p \leq 0,05$; & – достовірна різниця між групою ВКД ZT01 та групами ВКД ZT11 і ВКД вода, $p \leq 0,05$

них клітин в тканині, нормалізації розмірів адипоцитів та рівня прозапальних цитокінів (зокрема ІЛ-1β, ІЛ-8 та фактору некрозу пухлин α). Показана підвищена ефективність мелатоніну при вечірньому введенні та прийомі з питною водою.

Дотримання етичних стандартів. Усі експерименти на тваринах виконані з дотриманням міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються в експериментальних та інших наукових цілях (European convention, Strasbourg, 1986 р.), статті 26 Закону України «Про захист тварин від жорсткого поводження» (№3447-IV, від 21.02.2006 р.), а також усіх норм біоетики, біологічної безпеки та загальних етичних принципів експериментів на тваринах, ухвалені

Першим національним конгресом України з біоетики (вересень 2001 р.)

Конфлікт інтересів. Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

Фінансування. Це дослідження не отримувало будь-якого конкретного гранту від фінансуючих установ в державному, комерційному або некомерційному секторах.

CHANGES IN THE INFLAMMATION STATE OF WHITE ADIPOSE TISSUE IN RATS WITH DIET-INDUCED OBESITY AT DIFFERENT MODES OF MELATONIN ADMINISTRATION

O. Kalmukova, A. Yurchenko, A. Savchuk, M. Dzerzhynsky

Educational and scientific centre «Institute of Biology and Medicine»

Taras Shevchenko National University of Kyiv
64/13, Volodymyrs'ka St., 01601 Kyiv, Ukraine
E-mail: olesiakalmukova28@gmail.com

The effects of various modes (morning and evening) of melatonin (30 mg/kg/day for 7 weeks) administration on the inflammatory process in visceral white adipose tissue (presence of macrophages forming structures similar to the «crown»-like structures around adipocytes; the level of fibrosis and the mast cells number in white adipose tissue; the content of proinflammatory (IL-1 β , IL-8, tumor necrosis factor α , interferon γ) and anti-inflammatory (IL-4, IL-10) cytokines in blood serum) in rats with diet-induced obesity was investigated. After the administration of melatonin, obese rats demonstrated the decrease of macrophages and mast cells number in white adipose tissue, with a notable reduction of collagen fiber content (fibrosis) and adipocyte cell area. Evening administration of melatonin (one hour before light-off) showed greater efficacy compared to morning (one hour after light-on). In addition, serum of obese rats which received melatonin had increased levels of anti-inflammatory cytokines, while pro-inflammatory – on the contrary decreased. This indicates about manifestation of the anti-inflammatory properties of melatonin in the context of the obesity development and is a theoretical precondition for further consideration of the possibility to use it in the obesity treatment.

ИЗМЕНЕНИЯ СОСТОЯНИЯ ВОСПАЛЕНИЯ БЕЛОЙ ЖИРОВОЙ ТКАНИ КРЫС В УСЛОВИИ РАЗВИТИЯ ОЖИРЕНИЯ ПРИ РАЗНЫХ РЕЖИМАХ ВВЕДЕНИЯ МЕЛАТОНИНА

О.А. Калмыкова, А.В. Юрченко,
А.Н. Савчук, Н.Э. Дзержинский

Исследовано влияние различных режимов (утреннего и вечернего) введение мелатонина (30 мг/кг/сут в течение 7 недель) на ход воспалительного процесса в висцеральной белой жировой ткани (наличие макрофагов, образующих структуры подобные «короне» вокруг адипоцитов; уровень фиброза и количество тучных клеток в белой жировой ткани; содержание провоспалительных (ИЛ-1 β , ИЛ-8, фактор некроза опухоли α , интерферон γ) и противовоспалительных (ИЛ-4, ИЛ-10) цитокинов в сыворотке крови) в условиях развития высококалорийного ожирения у крыс. После применения мелатонина наблюдали уменьшение количества макрофагов и тучных клеток в белой жировой ткани у крыс с ожирением, а также было показано снижение содержания коллагеновых волокон (фиброза) и площади адипоцитов. Вечерние введение мелатонина (за час до отключения света) продемонстрировали большую эффективность по сравнению с утренними (через час после включения света). Кроме того,

в сыворотке крыс с ожирением при введении мелатонина повышался уровень противовоспалительных цитокинов, в то время как провоспалительных – наоборот снижался. Это указывает на проявление противовоспалительных свойств мелатонина в условиях развития ожирения и является теоретической предпосылкой для дальнейшего рассмотрения на предмет его использования для терапии ожирения.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Caër, C., Rouault, C., Le Roy, T., Poitou, C., Aron-Wisnewsky, J., Torcivia, A., Bichet, J., Clément, K., Guerre-Millo, M. and André, S. Immune cell-derived cytokines contribute to obesity-related inflammation, fibrogenesis and metabolic deregulation in human adipose tissue, *Scientific Reports*, 2017, vol. 7, no. 3000, pp. 1–11.
2. Rodríguez, A., Ezquerro, S., Méndez-Giménez, L., Becerril, S. and Frühbeck, G., Revisiting the adipocyte: a model for integration of cytokine signaling in the regulation of energy metabolism, *Amer. J. Physiol.-Endocrinol. Metabolism*, 2015, vol. 309, no. 8, pp. E691-E714.
3. Kang, Y.E., Kim, J.M., Joung, K.H., Lee, J.H., You, B.R., Choi, M.J., Ryu, M.J., Ko, Y.B., Lee, J., Ku, B.J., Shong, M., Lee, K.H., and Kim, H.J., The roles of adipokines, proinflammatory cytokines, and adipose tissue macrophages in obesity-associated insulin resistance in modest obesity and early metabolic dysfunction, *PLoS one*, 2016, vol. 11, no. 4, pp. e0154003.
4. Żelechowska, P., Agier, J., Kozłowska, E., and Brzezińska-Błaszczak, E. (2018). Mast cells participate in chronic low-grade inflammation within adipose tissue, *Obesity Reviews*, vol. 19, no 5, pp. 686–97.
5. Apostolopoulos, V., de Courten, M. P., Stojanovska, L., Blatch, G. L., Tangalakis, K. and de Courten, B. The complex immunological and inflammatory network of adipose tissue in obesity, *Mol. Nutr. Food Res.*, 2016, vol. 60, no. 1, pp. 43–57.
6. Cinti, S., Mitchell, G., Barbatelli, G., Murano, I., Ceresi, E., Faloia, E., Wang, S., Fortier, M., Greenberg, A., and Obin, M., Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans, *J. Lipid. Res.*, 2005, vol. 46, pp. 2347–55.
7. Jiang, C., Qu, A., Matsubara, T., Chanturiya, T., Jou, W., Gavrilova, O., Shah, Y., and Gonzalez, F.J., Disruption of hypoxia-inducible factor 1 in adipocytes improves insulin sensitivity and decreases adiposity in high-fat diet-fed mice, *Diabetes*, 2011, vol. 60, no. 10, pp. 2484–95.
8. Zhou, Y., Yu, X., Chen, H., Sjöberg, S., Roux, J., Zhang, L., Ivoulsou, A., Bensaid, F., Liu, C., Liu, J., Tordjman, J., Clement, K., Lee, C., Hotamisligil, G., Libby, P., and Shi, G., Leptin deficiency shifts mast cells toward anti-inflammatory actions and

- protects mice from obesity and diabetes by polarizing M2 macrophages, *Cell metabolism*, 2015, vol. 22, no. 6, pp. 1045–58.
9. Altintas M., Azad A., Nayer B., Contreras, G., Zaias, J., Faul, C., Reiser, J., and Nayer, A., Mast cells, macrophages, and crown-like structures distinguish subcutaneous from visceral fat in mice, *J. Lipid. Res.*, 2011, vol. 52, pp. 480–88.
 10. Toniato, E., Frydas, I., Robuffo, I., Ronconi, G., Caraffa, Al., Kritas, S., and Conti, P., Activation and inhibition of adaptive immune response mediated by mast cells, *J. Biol. Reg. Hom. Agents*, 2017, vol. 31, no. 3, pp. 543–8.
 11. Daryabor, G., Kabelitz, D., and Kalantar, K., An update on immune dysregulation in obesity-related insulin resistance, *Scandinavian. J. Immune.*, 2019, vol. 89, no. 4, pp. e12747–12763.
 12. Tordjman, S., Chokron, S., Delorme, R., Charrier, A., Bellissant, E., Jaafari, N., and Fougere, C., Melatonin: pharmacology, functions and therapeutic benefits, *Curr. Neuropharm.*, 2017, vol. 15, no. 3, pp. 434–43.
 13. Hardeland, R., Cardinali, D.P., Srinivasan, V., Spence, D.W., Brown, G.M., and Pandi-Perumal, S.R., Melatonin – A pleiotropic, orchestrating regulator molecule, *Progr. Neurobiol.*, 2011, vol. 93, no. 3, pp. 350–84.
 14. Amaral, F.G.D., Cipolla-Neto, J., A brief review about melatonin, a pineal hormone, *Archiv. Endocrinol. Metabolism*, 2018, vol. 62, no. 4, pp. 472–9.
 15. Reina, M., Martinez, A., A new free radical scavenging cascade involving melatonin and three of its metabolites (3OHM, AFMK and AMK), *Computat. Theoret. Chemistry*, 2018, vol. 1123, pp. 111–8.
 16. Cardinali, D.P., Hardeland, R., Inflammaging, metabolic syndrome and melatonin: a call for treatment studies, *Neuroendocrinol.*, 2017, vol. 104, no. 4, pp. 382–97.
 17. Calvo, J.R., Gonzalez-Yanes, C., Maldonado, M.D., The role of melatonin in the cells of the innate immunity: a review, *J. Pineal Res.*, 2013, vol. 55, no. 2, pp. 103–20.
 18. Laitinen, J.T., Castren, E., Vakkuri, O., and Saavedra, J.M., Diurnal rhythm of melatonin binding in the rat suprachiasmatic nucleus, *Endocrinol.*, 1989, vol. 124, no. 3, pp. 1585–7.
 19. Acuña-Castroviejo, D., Reiter, R. J., Menendez-Pelaez, A., Pablos, M. I. and Burgos, A. Characterization of high-affinity melatonin binding sites in purified cell nuclei of rat liver, *J. Pineal Res.*, 1994, vol. 16, no. 2, pp. 100–12.
 20. Gerdin, M.J., Masana, M.I., Rivera-Bermúdez, M.A., Hudson, R.L., Earnest, D.J., Gillette, M.U., and Dubocovich, M.L., Melatonin desensitizes endogenous MT2 melatonin receptors in the rat suprachiasmatic nucleus: relevance for defining the periods of sensitivity of the mammalian circadian clock to melatonin, *FASEB J.*, 2004, vol. 18, no. 14, pp. 1646–56.
 21. Dallmann, R., Brown, S.A., and Gachon, F., Chronopharmacology: new insights and therapeutic implications, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 2014, vol. 54, pp. 339–61.
 22. McKenna, H., van der Horst, G.T., Reiss, I., and Martin, D., Clinical chronobiology: a timely consideration in critical care medicine, *Critical Care*, 2018, vol. 22, no. 124, pp. 1–10.
 23. Dyar, K.A., Eckel-Mahan, K.L., Circadian metabolomics in time and space, *Frontiers in neuroscience*, 2017, vol. 11, no. 369, pp. 1–10.
 24. Shen, X.H., Tang, Q.Y., Huang, J., and Cai, W., Vitamin E regulates adipocytokine expression in a rat model of dietary-induced obesity, *Exper. Boil. Med.*, 2010, vol. 235, no. 1, pp. 47–51.
 25. Halenova, T., Raksha, N., Vovk, T., Savchuk, O., Ostapchenko, L., Prylutsky, Y., Kyzyma, O., Ritter, U., and Scharff, P., Effect of C60 fullerene nanoparticles on the diet-induced obesity in rats, *Inter. J. Obesity*, 2018, vol. 42, pp.1987–98.
 26. Kalmukova, O., Pustovalov, A., Vareniuk, I., and Dzerzhynsky, M., Effect of melatonin different time administration on the development of diet-induced obesity in rats, *Bull. Taras Shevchenko Nat. Un-ty Kyiv-Problems Physiol. Func. Regulat.*, 2018, vol. 23, no. 2, pp. 20–7.
 27. Suvarna, K., Layton, C., Bancroft, J.D., editors. Bancroft's theory and practice of histological techniques. 7th ed. Churchill Livingstone Elsevier; 2013. 654 p.
 28. Mishra, N.S., Wanjari, S.P., Parwani, R.N., Wanjari, P.V., and Kaothalker, S.P., Assessment of collagen and elastic fibres in various stages of oral sub-mucous fibrosis using Masson's trichrome, Verhoeff vangieson and picosirius staining under light and polarizing microscopy, *J. Dent Special*, 2015, vol. 3, no. 2, pp. 170–5.
 29. Spencer, M., Unal, R., Zhu, B., Rasouli, N., McGehee Jr, R.E., Peterson, C.A., and Kern, P.A., Adipose tissue extracellular matrix and vascular abnormalities in obesity and insulin resistance, *J. Clin. Endocrinol. Metabolism*, 2011, vol. 96, no. 12, pp. E1990–E1998.
 30. Altintas, M.M., Azad, A., Nayer, B., Contreras, G., Zaias, J., Faul, C., Reiser, J., and Nayer, A., Mast cells, macrophages, and crown-like structures distinguish subcutaneous from visceral fat in mice, *J. Lipid Res.*, 2011, vol. 52, no. 3, pp. 480–8
 31. Crowther, J.R., *The ELISA Guidebook*, Totowa, New Jersey: Humana Press Inc., 2001, pp. 436.
 32. Bradford, M.M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analyt. Biochem.*, 1976, vol. 72, no. 1–2, pp. 248–54.
 33. Martinez-Santibacez, G., Nien-Kai Lumeng, C., Macrophages and the regulation of adipose tissue remodeling, *Ann. Rev. Nutr.*, 2014, vol. 34, pp. 57–76.

34. Wu, J., Boström, P., Sparks, L.M., Ye, L., Choi, J.H., Giang, A.H., Khandekar, M., Virtanen, K., Nuutila, P., Schaart, G., Huang, K., Tu, H., Lichtenbelt, W., Hoeks, J., Enerback, S., Schrauwen, P., and Spiegelman, B., Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human, *Cell*, 2012, vol. 150, no. 2, pp. 366–76.
35. Harms, M., Seale, P., Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential, *Nat. med.*, 2013, vol. 19, no. 10, pp. 1252–63.
36. Jin, J.X., Lee, S., Taweechaipaisankul, A., Kim, G.A., and Lee, B.C., Melatonin regulates lipid metabolism in porcine oocytes, *J. Pineal Res.*, 2017, vol. 62, no. 2, pp. e12388.
37. Choe, S.S., Huh, J.Y., Hwang, I.J., Kim, J.I., and Kim, J.B., Adipose tissue remodeling: its role in energy metabolism and metabolic disorders, *Front. Endocrinol.*, 2016, vol. 7, no. 30, pp. 1–16.
38. Sadashiv, S.T., Paul, B.N., Kumar, S., Chandra, A., Dhananjai, S., and Negi, M.P., Over expression of resistin in adipose tissue of the obese induces insulin resistance, *World J. Diabetes*, 2012, vol. 3, no. 7, pp. 135–41.
39. Jialal, I., Adams-Huet, B., and Devaraj, S., Factors that promote macrophage homing to adipose tissue in metabolic syndrome, *J. Diabetes Complicat.*, 2016, vol. 30, no. 8, pp. 1434–6.
40. Sun, K., Tordjman, J., Clément, K., and Scherer, P.E., Fibrosis and adipose tissue dysfunction, *Cell metabolism*, 2013, vol. 18, no. 4, pp. 470–7.
41. Herro, R., Croft, M., The control of tissue fibrosis by the inflammatory molecule LIGHT (TNF Superfamily member 14), *Pharmacol. Res.*, 2016, vol. 104, pp. 151–5.
42. Halenova, T., Roslova, N., Vareniuk, I., Dzerzhynsky, M., Savchuk, O., Ostapchenko, L., Prylutsky, Y., Ritter, U., and Scharff, P., Hepatoprotective effect of orally applied water-soluble pristine C₆₀ fullerene against CCl₄-induced acute liver injury in rats, *RSC Adv.*, 2016, vol. 6, no. 102, pp. 100046–55.
43. Liu, J., Clough, S. J., Hutchinson, A. J., Adamah-Biassi, E. B., Popovska-Gorevski, M. and Dubocovich, M. L. MT1 and MT2 melatonin receptors: a therapeutic perspective, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 2016, vol. 56, pp. 361–83.
44. Cano Barquilla, P., Pagano, E.S., Jiménez-Ortega, V., Fernández-Mateos, P., Esquifino, A.I., and Cardinali, D.P., Melatonin normalizes clinical and biochemical parameters of mild inflammation in diet-induced metabolic syndrome in rats, *J. Pineal Res.*, 2014, vol. 57, no. 3, pp. 280–90.
45. Alamdari, N.M., Mahdavi, R., Roshanravan, N., Yaghin, N.L., Ostadrahimi, A.R., and Faramarzi, E., A double-blind, placebo-controlled trial related to the effects of melatonin on oxidative stress and inflammatory parameters of obese women, *Hormone Metabol. Res.*, 2015, vol. 47, n. 07, pp. 504–8.
46. Agil, A., Reiter, R.J., Jiménez-Aranda, A., Ibán-Arias, R., Navarro-Alarcyn, M., Marchal, J.A., Adem, A., and Fernández-Vázquez, G., Melatonin ameliorates low-grade inflammation and oxidative stress in young Zucker diabetic fatty rats, *J. Pineal Res.*, 2013, vol. 54, no. 4, pp. 381–8.
47. Favero, G., Stacchiotti, A., Castrezzati, S., Bonomini, F., Albanese, M., Rezzani, R., and Rodella, L.F., Melatonin reduces obesity and restores adipokine patterns and metabolism in obese (ob/ob) mice, *Nutrit. Res.*, 2015, vol. 35, no. 10, pp. 891–900.
48. Tamtaji, O.R., Mobini, M., Reiter, R.J., Azami, A., Gholami, M.S., and Asemi, Z., Melatonin, a toll-like receptor inhibitor: Current status and future perspectives, *J. Cell. Physiol.*, 2019, vol. 234, no. 6, pp. 7788–95.
49. Askenase, P.W., Itakura, A., Leite-de-Moraes, M.C., Lisbonne, M., Roongapinun, S., Goldstein, D.R., and Szczepanik, M., TLR-dependent IL-4 production by invariant V α +14+ J α 18+ NKT cells to initiate contact sensitivity in vivo, *J. Immunol.*, 2005, vol. 175, no. 10, pp. 6390–401.
50. Hardeland, R., Opposite effects of melatonin in different systems and under different conditions, *Curr. Top. Biochem. Res.*, 2016, vol. 17, pp. 57–69.
51. Carrillo-Vico, A., Lardone, P., Álvarez-Sánchez, N., Rodríguez-Rodríguez, A., and Guerrero, J., Melatonin: buffering the immune system, *Inter. J. Mol. Sci.*, 2013, vol. 14, no. 4, pp.8638–83.
52. Hardeland, R., Melatonin and inflammation – Story of a double-edged blade, *J. Pineal Res.*, 2018, vol. 65, no. 4, pp. e12525.

Надійшла в редакцію 26.01.19
Після доопрацювання 13.06.19
Прийнята до друку 18.01.20