

Морфологическая реакция GFAP+ клеток тимуса на поступление мелатонина в разных световых условиях

Е.М. Лузикова, А.В. Московский, Ю.Н. Уруков

ФГБОУ ВО Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова, Чебоксары, Россия

Резюме. Введение. Популяция клеток тимуса, формирующаяся из нервного гребня, может быть выявлена с помощью антител к глиальному фибриллярному кислому белку (GFAP) и не перекрывается с популяцией клеток, содержащих нейронспецифическую енолазу (NSE). Цель исследования состояла в изучении реакции GFAP+ клеток тимуса на изменение фотопериода и введение мелатонина.

Материалы и методы. Проведено сравнительное исследование GFAP+ клеток тимуса 4-недельных нелинейных мышей, которые были разделены на шесть групп: I и II группы содержали в условиях естественного фотопериода, III и IV группы в условиях постоянного затемнения, V и VI группы в условиях постоянного освещения в течение 4 недель. Препарат мелаксен *ad libitum* в концентрации 4 мг/л с питьевой водой на протяжении 4 недель получали животные II, IV и VI групп. Антитела к GFAP использовались для выявления астроцитоподобных клеток в тимусе.

Результаты. В дольке тимуса GFAP+ клетки диффузной эндокринной системы встречаются в кортикомедуллярной, субкапсулярной зонах, толще коркового вещества долек. В условиях постоянного освещения (24/24) отмечалось увеличение количества исследуемых клеток в кортикомедуллярной зоне долек, а оптическая плотность GFAP снижалась во всех исследуемых клеточных зонах. При поступлении мелатонина в условиях постоянного освещения в течение 4 недель наблюдалось снижение общего числа исследуемых клеток, увеличение содержания GFAP в клетках диффузной эндокринной системы и одновременно снижение площади инволюции в тимусе.

Заключение. Наше исследование показало, что GFAP+ клетки вилочковой железы чувствительны к изменению фотопериода. В условиях постоянного освещения наблюдались выраженные морфологические изменения в GFAP+ клетках, которые сопровождались деструктивными изменениями в дольках тимуса и нивелировались при введении мелатонина.

Ключевые слова: глиальный фибриллярный белок, диффузная эндокринная система, тимус, мелатонин, фотопериод

Для корреспонденции: Елена Михайловна Лузикова. E-mail: nema76@mail.ru

Для цитирования: Лузикова Е.М., Московский А.В., Уруков Ю.Н. Морфологическая реакция GFAP+ клеток тимуса на поступление мелатонина в разных световых условиях. Клини. эксп. морфология. 2025;14(2):60–69. DOI: 10.31088/CEM2025.14.2.60-69.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках государственного бюджетного финансирования.

Статья поступила 01.10.2024. Получена после рецензирования 21.10.2024. Принята в печать 02.12.2024.

Morphological reaction of GFAP+ thymus cells to melatonin supply under different light conditions

Е.М. Luzikova, A.V. Moskovsky, Yu.N. Urukov

I.N. Ulyanov Chuvash State University, Cheboksary, Russia

Abstract. Introduction. The neural crest-derived thymic cell population can be detected using glial fibrillary acidic protein (GFAP) antibodies and it does not overlap with the neuron-specific enolase (NSE+) cell population. We focused on investigating the response of GFAP+ thymic cells to photoperiod changes and melatonin administration.

Materials and methods. We performed a 4-week experiment on sixty 3-week-old male Wistar rats, which were divided into 6 groups: groups I and II were kept in the natural photoperiod; groups III and IV were in constant darkness; and groups V and VI were observed under constant light (24 hours). Subjects from groups II, IV, and VI were given *ad libitum* access to drinking water with “Melaxen” at a concentration of 4 mg/L. Antibodies to GFAP were used to detect astrocyte-like cells in the thymus.

Results. In the thymus lobule, GFAP+ cells were found in the corticomedullary and subcapsular zones, as well as in the cortical thickness of the lobules. Under the conditions of constant light, the number of the studied cells increased in the premedullary zone of the lobules, whereas the optical density of glial fibrillary acidic protein decreased in all studied cell zones. In groups V and VI, we observed a decrease in the total number of the studied cells and thymus involution area, as well as an increase in the content of glial fibrillary acidic protein in the cells of the diffuse endocrine system.

Conclusion. Our study has shown that GFAP+ cells of the thymus gland are sensitive to photoperiod changes. Under conditions of constant light, pronounced morphological changes are observed in GFAP+ cells. The changes are accompanied by destructive changes in the thymus lobules and can be leveled by melatonin introduction.

Keywords: glial fibrillary protein, diffuse endocrine system, thymus gland, melatonin, photoperiod

Corresponding author: Elena M. Luzikova. E-mail: nema76@mail.ru

For citation: Luzikova E.M., Moskovsky A.V., Urukov Yu.N. Morphological reaction of GFAP+ thymus cells to melatonin supply under different light conditions. Clin. exp. morphology. 2025;14(2):60–69 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2025.14.2.60-69.

Funding. The study was carried out within the framework of state budget funding.

Received 01.10.2024. **Received in revised form** 21.10.2024. **Accepted** 02.12.2024.

Введение

Диффузная эндокринная система (ДЭС) тимуса регулирует пролиферацию и антигеннезависимую дифференциацию Т-лимфоцитов, контролирует миграцию и антигензависимую дифференциацию лимфоцитов в периферических иммунных органах, адаптацию к изменяющимся условиям внешней среды. У позвоночных животных выделяют три разные популяции клеток ДЭС тимуса: аргентафинные клетки, аргирофильные клетки и биоаминсодержащие клетки [1]. В тимусе птиц были выявлены три популяции клеток ДЭС, имеющих одинаковую локализацию и являющихся тремя разными популяциями нейрональных/нейроэндокринных клеток: клетки, содержащие хромогранин А (CgA+), клетки, формирующиеся из нервного гребня (HNK-1+), и клетки, содержащие нейронспецифическую енолазу (NSE+) [2].

Клетки тимуса, формирующиеся из нервного гребня, могут быть выявлены с помощью антител к GFAP – глиальному фибриллярному кислом белку [3]. В тимусе GFAP+ являются афферентные и эфферентные нервные волокна, а также отростчатые клетки, которые образуют тесную «синапсоподобную» ассоциацию отростков немиелинизирующих шванновских клеток с различными подмножествами дендритных клеток и лимфоцитами – В-клетками, CD4+/CD8+ тимоцитами [4].

GFAP – это белок промежуточных филаментов (IF) типа III, который экспрессируется в астроцитах нервной системы [5, 6], глиальных клетках мезентериальной нервной системы [7–9], органах чувств [10, 11], селезенке [12], печени [13]. GFAP участвует в регуляции шаперонопосредованной аутофагии [14], оказывает положительное влияние на импорт D-аспартата через плазматическую мембрану и внутриклеточный транспорт белков [15].

Периодическая смена темного и светлого времени суток обеспечивает биохимические и физиологические

ритмы подавляющего большинства организмов нашей планеты. Нарушение естественного ритма свет/темнота является стрессом для животных с дневной и ночной активностью, а длительное отсутствие фотопериодичности приводит к морфологическим изменениям в разных органах. Например, постоянный свет индуцирует оксидативный стресс и аутофагию клеток гиппокампа мышей [16], снижает число CD4+, CD8+, CD3+ клеток селезенки, подавляет дифференцировку и созревание молодых тимоцитов и обуславливает инволюцию тимуса [17]. Постоянное затемнение приводит к снижению числа дендритов и плотности шипиков нейронов в гиппокампе дневных животных, а постоянный свет к аналогичному снижению нейронной сложности в гиппокампе дневных и ночных животных [18].

Анализ научной литературы показывает, что в последние два десятилетия объем экспериментальных и клинических данных, свидетельствующих о метаболизме и иммуномодулирующих свойствах мелатонина, значительно увеличился. Это обусловлено большим числом терапевтических эффектов мелатонина: противовоспалительным [19], антиоксидантным, геропротекторным [20], онкопротекторным [21, 22]. Не подлежит сомнению, что в основе всех этих эффектов лежит иммуномодулирующая способность мелатонина. Тем не менее информации о том, как взаимосвязаны нервный, иммунный компоненты в лимфоидных органах в экспериментальной модели с изменением фотопериода, недостаточно.

Цель настоящего исследования состояла в изучении реакции GFAP+ клеток тимуса на отсутствие фотопериодичности и введение мелатонинсодержащего препарата мелаксен.

Материалы и методы

Объектом гистологического исследования служил тимус 60 половозрелых белых нелинейных мышей-самцов. Критерии включения: пол (самцы), возраст

3 недели (на сроке 3,5–4 недели тимус мышей развит максимально, с 4 недель начинается возрастная инволюция), масса 11–12 граммов, нормальная активность (подвижность оценивали с помощью теста «Открытое поле»), густая блестящая шерсть, нормальный аппетит (мышь должна принимать пищу в 07:00 при кормлении). Критерии исключения: недостаточный или избыточный вес, редкая тусклая шерсть, недостаточная подвижность, агрессия, плохой аппетит (мышь не ели при кормлении в 07:00). При проведении исследования мы руководствовались положениями Европейской конвенции по защите позвоночных животных (18.03.1986). Модель исследования одобрена локальным этическим комитетом Чувашского государственного университета имени И.Н. Ульянова (протокол № 5 от 10.11.2023).

Мелатонин вводили перорально (мелаксен, Unipharm, Inc., США) *ad libium* в концентрации 4 мг/л с питьевой водой в течение 4 недель, поскольку он легко проникает через кишечный и гематоэнцефалический барьер, после экзогенного введения обнаруживается в крови и мозге в высоких концентрациях [23]. Регистрировали объем выпиваемой жидкости в клетке с 10 животными в течение 10 дней перед началом эксперимента и вычисляли средний объем для расчета дозы препарата на одну клетку. Затем проводили вычисление среднего объема выпиваемой жидкости в конце каждой недели эксперимента. В первую неделю было установлено, что ежедневно мышь выпивает в среднем $1,35 \pm 0,31$ мл, начиная с третьей недели объем выпиваемой жидкости увеличился до $1,97 \pm 0,23$ мл ($M \pm m$) раствора. Рассчитанная доза мелатонина для мыши с учетом 15% биодоступности составила в среднем 0,05 мг (26 мг/кг).

Животные были распределены на шесть групп.

I – животные ($n=10$), которые содержались в течение 4 недель эксперимента в обычных условиях вивария (естественное освещение; продолжительность светового дня 8–9 часов (9/24); освещенность на уровне клеток в утренние часы 50–150 люкс, днем в пасмурный день до 300 люкс, в ясный день до 800 люкс, вечером 100–200 люкс; свободный доступ к питьевой воде и корму).

II – животные ($n=10$), получавшие синтетический мелатонин *ad libium* в виде водного раствора в концентрации 4 мг/л, находившегося в свободном доступе в поилке (что составляет в среднем на одно животное 30 мг в сутки) в течение 4 недель, содержались в обычных условиях вивария (естественное освещение; продолжительность светового дня 8–9 часов; освещенность на уровне клеток в утренние часы 50–150 люкс, днем в пасмурный день до 300 люкс, в ясный день до 800 люкс, вечером 100–200 люкс; свободный доступ к питьевой воде и корму).

III – животные ($n=10$), находившиеся в условиях постоянного затемнения (клетки размещались в темной комнате, освещенность в клетках в течение дня

составляла 0,5–1 люкс (0/24), при кормлении 7–9 люкс) в течение 4 недель. Животные имели свободный доступ к питьевой воде и корму.

IV – животные ($n=10$), получавшие синтетический мелатонин *ad libium* в концентрации 4 мг/л с питьевой водой в течение 4 недель и находившиеся в условиях постоянного затемнения (освещенность в клетках в течение дня составляла 0,5–1 люкс (0/24); при кормлении 7–9 люкс). Животные имели свободный доступ к питьевой воде и корму.

V – животные ($n=10$), находившиеся в условиях постоянного освещения (24/24, 700 люкс) в течение 4 недель (свободный доступ к питьевой воде и корму).

VI – животные ($n=10$), получавшие синтетический мелатонин *ad libium* в концентрации 4 мг/л с питьевой водой в течение 4 недель и находившиеся в условиях освещения (24/24, 700 люкс; свободный доступ к питьевой воде и корму).

По окончании эксперимента мышам был 1 месяц и 3 недели. Их масса в среднем составляла $19,4 \pm 1,3$ грамма. Животные были выведены из эксперимента методом ингаляции диоксида углерода. Тимусы извлекли сразу после усыпления на 28-е сутки эксперимента и фиксировали в 10% формалине с последующей заливкой в парафин. Все действия, предусматривавшие контакт с лабораторными мышами, осуществлялись с учетом требований Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных (приказ Минздрава России от 19.06.2003 № 267).

Антитела к GFAP (клон SPM507, Spring Bioscience, США, в разведении 1:100) применяли для выявления астроцитоподобных клеток ДЭС в тимусе [24] и безмиелиновых нервных волокон [4].

Препараты обрабатывались одновременно по следующему алгоритму.

- 1) Депарафинизация в ксилоле и регидратация в спиртах нисходящей концентрации с последующим промыванием в дистиллированной воде 2–5 минут;
- 2) блокирование эндогенной пероксидазы в 3% водном растворе перекиси водорода 10 минут при комнатной температуре, промывание в дистиллированной воде 2–5 минут;
- 3) перенесение стекол в 0,01 М фосфатно-солевой буфер (ФСБ) pH 7,4 на 5 минут (на этом этапе обработки и далее ФСБ может быть заменен трис-солевым буфером с pH 7,6);
- 4) инкубация с первичными антителами к GFAP во влажной камере при температуре $+40^\circ\text{C}$ 30 минут с последующим промыванием в ФСБ в течение 5 минут;
- 5) инкубация со вторичными антикроличьими или антимышинными антителами, соответственно, конъюгированными с полимером и пероксидазой хрена (EnVision+, Dako, Дания) 35 минут при комнатной температуре, далее промывание в ФСБ в течение 5 минут;
- 6) инкубация с раствором 3,3-диаминобензидинтетрагидрохлорида (DAB+, Dako, Дания) под визуальным контролем, не допуская появления неспецифического фона, 2–3 минуты, затем промывание в 2–3 порциях дистиллированной воды по 3–5 минут

в каждой; 7) подкрашивание препаратов гематоксилином Джилла в течение 30 секунд с последующим подсинением в щелочной воде; 8) дегидратация в спиртах восходящей концентрации, просветление в ксилоле и заключение в полистирол или другие перманентные среды.

Статистическая обработка. Количество клеток и оптическая плотность GFAP были рассчитаны при помощи программы SigmaScan Pro 5.0 (Systat, США) и микроскопа Axio Scope A1 (Carl Zeiss, Германия) при $\times 400$. Выводы о содержании вещества в клетках делали, измеряя его оптическую плотность в 100 клетках по каждому животному, исключая поврежденные или явно атипичные. В качестве фона вводилось изображение чистого предметного стекла. Для исключения неточности в подсчетах оптической плотности срезы органов животных сравниваемых экспериментальных групп окрашивали одновременно.

Оптическая плотность – мера непрозрачности слоя вещества для световых лучей, то есть степень поглощения света изучаемым объектом. Чем больше света поглощает объект, тем выше его оптическая плотность.

$$D = \lg (F_0/F),$$

где F_0 – световой поток, падающий на образец; F – световой поток, прошедший через образец.

Оптическая плотность является безразмерной величиной, измеряется от 0 (полное пропускание) до 2 (полное поглощение). Оптическая плотность прямо пропорциональна толщине поглощающего слоя, а также концентрации вещества в образце:

$$D = x \times c \times h,$$

где x – удельный показатель поглощения вещества; c – концентрация вещества; h – толщина поглощающего слоя.

При анализе клеток в препарате выбор объекта измерения осуществлялся по принципу случайного бесповторного отбора. Измеряли все клетки подряд, причем по возможности в разных участках среза, исключая поврежденные или явно атипичные [25].

Для оценки инволюции тимуса делали 10 замеров площади соответствующих участков по каждому животному и вычисляли среднее значение по каждой экспериментальной группе.

Описательную статистическую обработку проводили при помощи программы Statistica 17 (IBM, США). Для анализа количества и оптической плотности исследуемых клеток использовали непараметрические статистические методы, так как выявлено ненормальное распределение, точки данных независимы. Сведения по количеству и оптической плотности исследуемых клеток представлены в виде $Me \pm SEM$. Использовали U-критерий Манна–Уитни и критерий Краскела–Уоллиса. Информация по площади инволюции представлена в виде $M \pm SE$, так как выявлено нормальное распределение данных. Был рассчитан

критерий Стьюдента. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,01$.

Результаты

GFAP+ клетки в тимусе животных, содержащихся при естественной смене световой и темновой фаз, встречались в наружной субкапсулярной зоне (СЗ), во внутренней корковой зоне, в кортикомедуллярной зоне (КМЗ) и мозговом веществе (МВ) дольки, но число исследуемых клеток преобладало в мозговом веществе и кортикомедуллярной зоне коркового вещества дольки (рис. 1 А, 2 А). GFAP+ клетки МВ отростчатые, со слабой экспрессией GFAP (оптическая плотность $0,14 \pm 0,005$) (рис. 1 В). В СЗ коркового вещества дольки исследуемые клетки были непостоянной округло-овальной формы, не имели отростков, средняя оптическая плотность GFAP равнялась $0,43 \pm 0,01$ (рис. 1 С). В КМЗ локализовались клетки полигональной формы с выраженной экспрессией GFAP (оптическая плотность $0,69 \pm 0,02$), без отростков (рис. 1 Е).

В капсуле и септах тимуса, толще коркового вещества, адвентиции сосудов выявлялись GFAP+ нервные волокна (рис. 1 D, F).

В условиях постоянного затемнения (0/24) не выявлены достоверные изменения числа GFAP+ клеток ДЭС в МВ долек тимуса и КЗ (рис. 2 С), но в СЗ долек мы наблюдаем снижение числа исследуемых клеток в 2 раза ($p=0,02$). Оптическая плотность GFAP снижалась в клетках ДЭС КМЗ в 1,2 раза ($p=0,0008$), в клетках ДЭС СЗ в 1,6 раза ($p=0,0004$).

В отсутствие темного периода, при постоянном освещении (24/24) увеличилось число исследуемых клеток в КМЗ долек в 1,5 раза ($p=0,004$), а в СЗ долек в 3 раза ($p=0,006$) (рис. 2 Е). Число GFAP+ клеток в мозговом веществе долек снижалось в 6,3 раза ($p=0,0003$) (рис. 3 А). В условиях постоянного освещения (24/24) оптическая плотность GFAP снижалась во всех исследуемых группах клеток: в клетках ДЭС МВ в 7 раз ($p=0,005$), в клетках ДЭС КМЗ в 2 раза ($p=0,0009$), в клетках ДЭС СЗ в 2 раза ($p=0,005$) (рис. 3 В).

В группе мышей, содержащихся при постоянном затемнении (0/24), наблюдалась наименьшая средняя площадь инволюции тимуса – $384\ 638 \pm 458$ мкм². Показатели данной группы незначительно отличались от контрольных ($469\ 761 \pm 1009$ мкм²). Наибольшую же площадь инволюции тимуса ($650\ 837 \pm 1722$ мкм²) имел тимус мышей, которые содержались при постоянном освещении (24/24).

Поступление мелатонина в условиях естественной смены световой и темновой фаз (9/15) приводило к уменьшению числа GFAP+ клеток ДЭС в мозговом веществе долек тимуса в 1,4 раза ($p=0,006$) и значительному увеличению названных выше клеток в КМЗ долек в 4,6 раза ($p=0,01$) (рис. 2 В). Оптическая плотность GFAP снижалась во всех исследуемых группах клеток: в клетках ДЭС МВ в 2,8 раза ($p=0,0008$), в клетках ДЭС

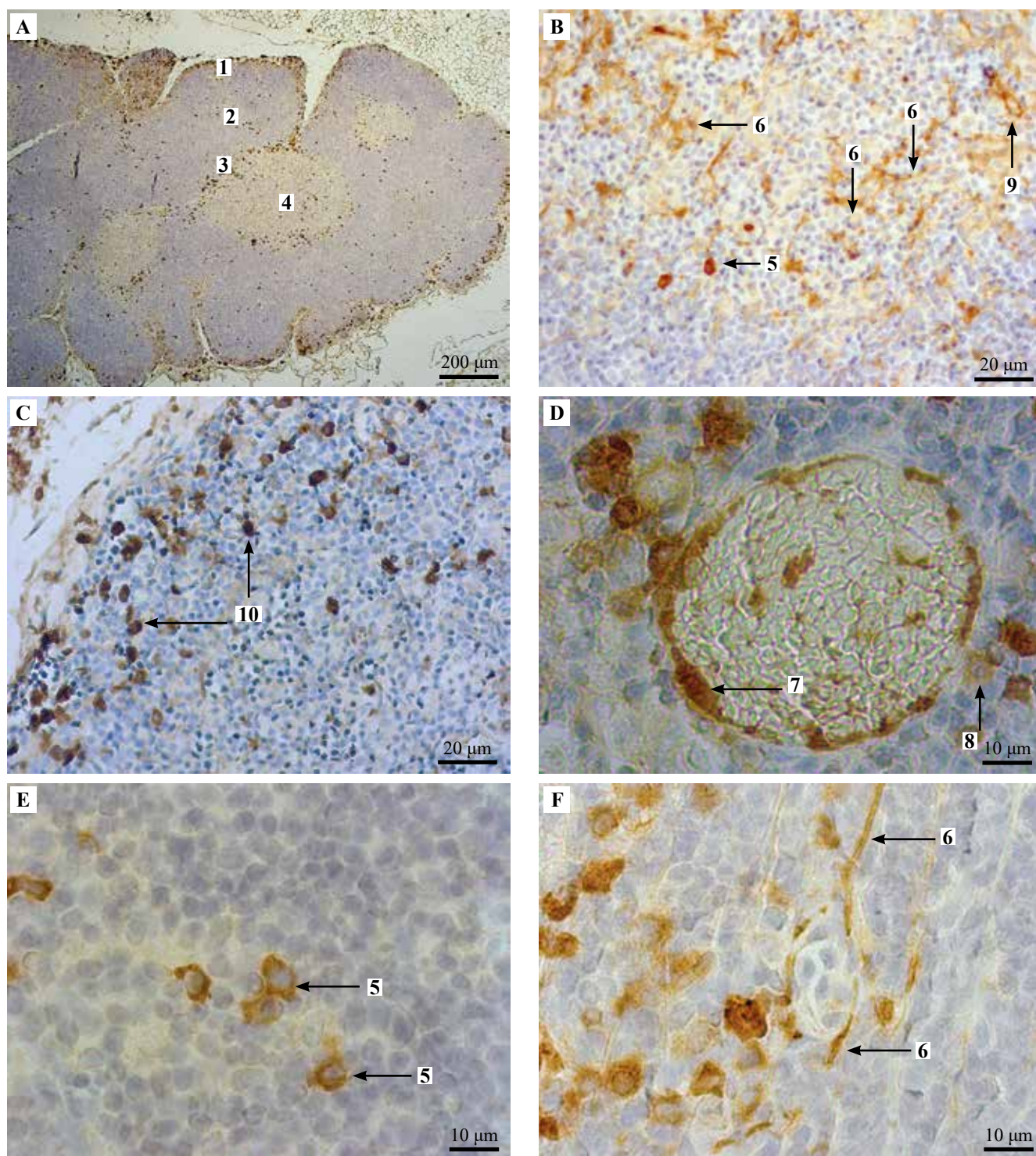


Рис. 1. GFAP+ клетки тимуса мышей из группы контроля.

1 – субкапсулярная зона коркового вещества дольки, 2 – внутренняя корковая зона дольки, 3 – кортикомедулярная зона коркового вещества дольки, 4 – мозговое вещество дольки, 5 – GFAP+ клетки кортикомедулярной зоны, 6 – вегетативные нервные волокна в корковом веществе дольки тимуса, 7 – эндотелий, 8 – GFAP+ клетки мозгового вещества долек, 10 – GFAP+ клетки субкапсулярной зоны коркового вещества долек. А – $\times 40$, В, С – $\times 400$, D, E, F – $\times 1000$

Fig. 1. GFAP+ cells of the thymuses in the control group (group I). IHC reaction of antibodies to GFAP

1 – subcapsular zone of the lobular cortex, 2 – inner cortical zone of the lobule, 3 – corticomedullary zone of the lobule, 4 – medulla, 5 – GFAP+ cells of the corticomedullary zone, 6 – autonomic GFAP+ nerve fibers in the thymic lobule cortex, 7 – endothelium, 8 – GFAP+ cells of the medullary substance, 9 – GFAP+ nerve fibers in the adventitial layer of blood vessels, 10 – GFAP+ cells of the subcapsular zone of the lobule. A – $\times 40$, B, C – $\times 400$, D, E, F – $\times 1000$

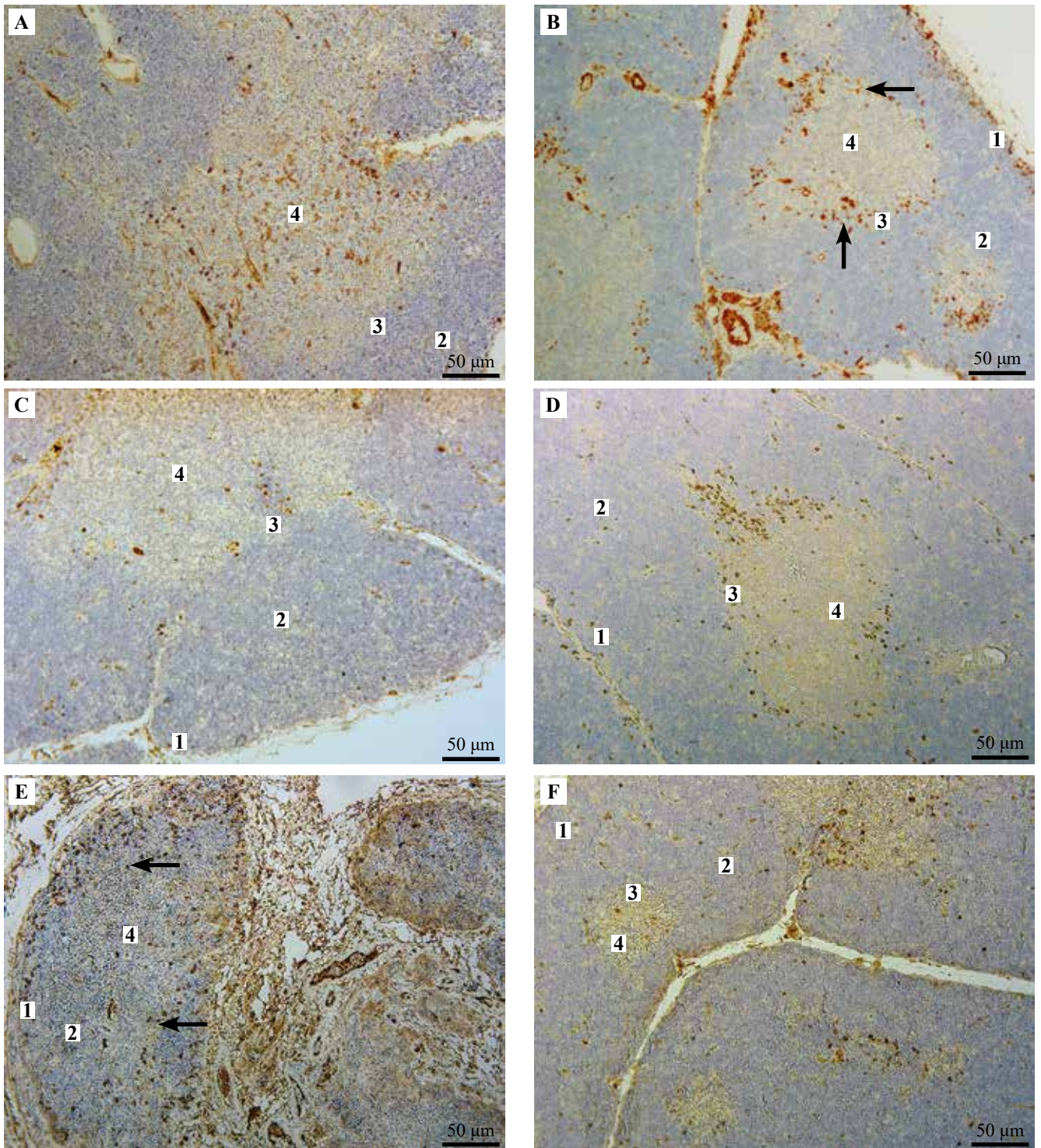


Рис. 2. Локализация GFAP+ клеток в дольках тимуса мышей разных экспериментальных групп.

А – при естественном освещении (I); В – при естественном освещении и получавших мелатонин (II); С – в условиях затемнения (III); D – в условиях затемнения и получавших мелатонин (IV); E – при постоянном освещении (V); F – при постоянном освещении и получавших мелатонин в течение 4 недель (VI). ИГХ окрашивание антителами к GFAP, $\times 100$. Стрелками показано увеличение количества GFAP+ в кортикомедуллярной зоне 1 – субкапсулярная зона коркового вещества дольки, 2 – внутренняя корковая зона дольки, 3 – кортикомедуллярная зона коркового вещества дольки, 4 – мозговое вещество дольки.

Fig. 2. Localization of GFAP+ cells in the thymus lobules of different experimental groups. IHC assay to GFAP, $\times 100$.

A – animals kept in natural photoperiod (group I); B – animals kept in natural photoperiod and given melatonin (group II); C – animals kept in constant darkness (group III); D – animals kept in constant darkness and given melatonin (group IV); E – animals kept in constant light (group V); F – animals kept in constant light and given melatonin (group VI). Arrows indicate an increase in the number of GFAP+ cells in the corticomedullary zone 1 – subcapsular zone of the lobular cortex, 2 – inner cortical zone of the lobule, 3 – corticomedullary zone of the lobule, 4 – medulla.

КМЗ в 1,5 раза ($p=0,001$), в клетках ДЭС СЗ в 3,3 раза ($p=0,0004$) (рис. 3).

На фоне поступления мелатонина в условиях отсутствия световой фазы при постоянном затемнении (0/24) снижалось число GFAP+ клеток ДЭС в мозговом веществе долек в 1,2 раза ($p=0,01$) и в СЗ коркового

вещества долек тимуса в 2 раза ($p=0,02$) (рис. 2 D). Оптическая плотность GFAP снижалась в клетках ДЭС МВ в 2,3 раза ($p=0,002$), в клетках ДЭС КМЗ в 2 раза ($p=0,0001$) (рис. 3).

Поступление мелатонина в условиях постоянного освещения восстанавливало экспрессию GFAP+ в стромальных клетках ДЭС мозгового вещества долек. Число GFAP+ клеток было снижено по сравнению с контрольными значениями (I группа), но наблюдалось повышение данного показателя по сравнению с V группой в 2,6 раза ($p=0,05$) (рис. 3 A). В дольках тимуса животных данной экспериментальной группы отмечено уменьшение числа клеток в КМЗ в 2 раза ($p=0,001$) (рис. 2 F).

Оптическая плотность GFAP повышалась во всех исследуемых морфофункциональных зонах: в клетках ДЭС МВ в 4 раза ($p=0,0003$), в клетках ДЭС КМЗ в 1,3 раза ($p=0,04$), в клетках ДЭС СЗ в 1,8 раза ($p=0,001$) (рис. 3 B). Одновременно происходило уменьшение средней площади инволюции тимуса в 1,9 раза (S инволюции = 3 379 106 мкм²).

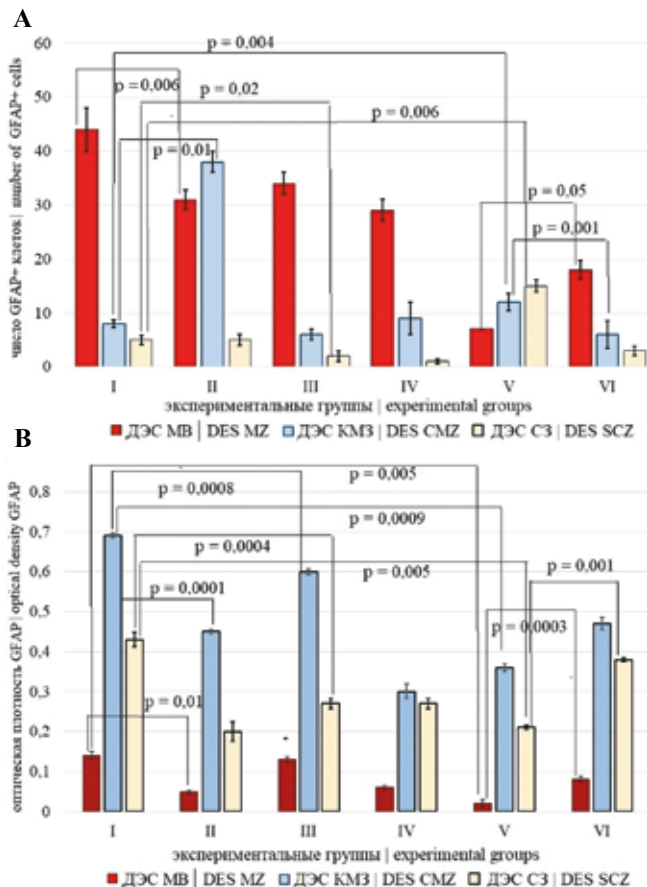


Рис. 3. Изменение числа (A) и оптической плотности (B) GFAP+ клеток в дольках тимуса мышей разных экспериментальных групп.

I – при естественном освещении; II – при естественном освещении и получавших мелатонин; III – в условиях затемнения; IV – в условиях затемнения и получавших мелатонин; V – при постоянном освещении; VI – при постоянном освещении и получавших мелатонин в течение 4 недель.

ДЭС МВ – клетки мозгового вещества дольки, ДЭС КМЗ – клетки кортикомедуллярной зоны коркового вещества дольки, ДЭС СЗ – клетки субкапсулярной зоны коркового вещества дольки

Fig. 3. Changes in the number (A) and optical density (B) of GFAP+ cells in the thymus lobules of mice from different experimental groups:

group I – animals kept in natural photoperiod; group II – animals kept in natural photoperiod and given melatonin; group III – animals kept in constant darkness; group IV – animals kept in constant darkness and given melatonin; group V – animals kept in constant light; group VI – animals kept in constant light and given melatonin.

DES-Med – cells of the medulla, DES-CMZ – cells of the corticomedulary zone of the lobular cortex, DES-SCZ – cells of the subcapsular zone of the lobular cortex

Обсуждение

В дольке тимуса GFAP+ клетки ДЭС встречаются в кортикомедуллярной, субкапсулярной зонах, толще коркового вещества и мозговом веществе долек. Изменение количества и морфологических параметров GFAP+ клеток демонстрирует перемену в активности клеток ДЭС, формирующихся из нервного гребня [3], и, вероятно, является отражением адаптивных либо деструктивных процессов. В условиях постоянного освещения (24/24) отмечается увеличение количества исследуемых клеток в КМЗ долек, а оптическая плотность GFAP снижается во всех исследуемых группах клеток. Глиальный фибриллярный кислый белок входит в состав цитоскелета и участвует в шаперонзависимой аутофагии [14], оказывает положительное влияние на импорт через плазматическую мембрану D-аспартата [15], который при увеличении содержания в клетке вызывает антипролиферативное действие, что было отмечено в лимфоцитах [26] и фибробластах [27]. Выявленное снижение содержания GFAP в условиях постоянного освещения может свидетельствовать о деструктивных изменениях в исследуемых клетках, что подтверждается усилением инволюционного процесса в тимусе. Таким образом, изменение содержания GFAP посредством регуляции внутриклеточной и межклеточной концентрации D-аспартата может влиять на пролиферацию Т-лимфоцитов.

Еще одной популяцией клеток периферического звена ДЭС являются биоаминпродуцирующие клетки, локализация которых совпадает с популяцией GFAP+ клеток [28]. Известно, что в центральной нервной системе GFAP+ астроциты вырабатывают мелатонин и серотонин [29]. Если предположить, что и в тимусе популяции биоаминпродуцирующих и GFAP+ пересекаются, то снижение уровня GFAP может быть связано

с повышением уровня серотонина в клетках ДЭС КМЗ и в микроокружении лимфоцитов и, как следствие, усилением инволюции тимуса [28, 30].

Амфифильность мелатонина позволяет ему проникать через клеточные и ядерные мембраны и напрямую взаимодействовать с внутриклеточными структурами. Основные эффекты мелатонина связаны с действием на мембранные рецепторы лимфоцитов – MT1, MT2, MT3 и ядерные рецепторы, принадлежащие к суперсемейству рецепторов ретиноевой кислоты ROR α (NR1F1) и ROR β (NR1F2) [31]. В исследованиях L.P. Niles, K.J. Armstrong и других выявлено, что MT1 рецепторы закладываются в прогениторных GFAP+ глиальных клетках нервной системы [32] и их стимуляция приводит к увеличению содержания GFAP в клетках и числа GFAP+ клеток [33].

Почему при поступлении мелатонина в условиях естественной смены темновой и световой фаз и при постоянном затемнении наблюдается уменьшение содержания GFAP, а при поступлении мелатонина в условиях постоянного освещения в течение 4 недель увеличение содержания GFAP в клетках ДЭС? Вероятно, при естественном фотопериоде и постоянном затемнении синтез пинеального мелатонина не нарушен и его воздействие кооперируется с экзогенным мелатонином. При постоянном же освещении синтез пинеального мелатонина подавлен. При этом важно учитывать и собственную продукцию мелатонина клетками ДЭС и лимфоцитами тимуса. Предполагаем, что превращение серотонина в мелатонин в клетках ДЭС и лимфоцитах тимуса в условиях освещения 24/24 также подавляется, так как в них происходит накопление серотонина [28]. Накопление серотонина в микроокружении лимфоцитов может являться основной причиной апоптоза последних, нарушая метаболизм триптофана и участвуя в развитии окислительного стресса [34], и именно в условиях иммуносупрессии проявляется стимулирующий эффект экзогенного мелатонина на пролиферацию лимфоцитов [35]. Зафиксировано снижение площади инволюции в тимусе по сравнению с группой животных, содержавшихся в аналогичных условиях и не получавших мелатонин. Выявленные в тимусе изменения под влиянием мелатонина сходны с изменениями в центральной нервной системе в условиях сдвига окислительно-восстановительного гомеостаза, когда наблюдаются снижение астроглиоза и нормализация содержания GFAP [36–38].

Заключение

Наше исследование выявило чувствительность GFAP+ клеток диффузной эндокринной системы тимуса к отсутствию фотопериодичности. Мелатонин стабилизирует GFAP+ клетки тимуса, нормализуя в них содержание глиального фибриллярного белкового белка независимо от условий освещения, что дополняет знания о механизмах его геропротекторного действия.

Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – Е.М. Лузикова.
Сбор и обработка материала – Е.М. Лузикова.
Написание текста – Е.М. Лузикова, А.В. Московский.
Редактирование – Ю.Н. Уруков.

Author contribution

Conceived the study and design the experiment – E.M. Luzikova.
Collected the data and performed the analysis – E.M. Luzikova.
Wrote the paper – E.M. Luzikova, A.V. Moskovsky.
Edited the manuscript – Yu.N. Urukov.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

Литература/References

1. Mishra UK. Cytochemical identification of endocrine thymus of chicken in relation to aging. *Vet Res Forum*. 2013;4(3):137–43. PMID: 25653787.
2. Oubre CM, Zhang X, Clements KE, Porter TE, Berghman LR. Immunohistochemical assessment of the neurosecretory cells of the chicken thymus using a novel monoclonal antibody against avian chromogranin A. *Dev Comp Immunol*. 2004;28(4):337–45. DOI: 10.1016/j.dci.2003.08.008.
3. Boahen A, Hu D, Adams MJ, Nicholls PK, Greene WK, Ma B. Bidirectional crosstalk between the peripheral nervous system and lymphoid tissues/organs. *Front Immunol*. 2023;14:1254054. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1254054.
4. Hu D, Nicholls PK, Yin C, Kelman K, Yuan Q, Greene WK et al. Immunofluorescent localization of non-myelinating Schwann cells and their interactions with immune cells in mouse thymus. *J Histochem Cytochem*. 2018;66(11):775–85. DOI: 10.1369/0022155418778543.
5. Tan X, Neslund EM, Fentis K, Ding ZM. Fluorocitrate inhibition of astrocytes reduces nicotine self-administration and alters extracellular levels of glutamate and dopamine within the nucleus accumbens in male wistar rats. *Neuropharmacology*. 2024;255:110001. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2024.110001.
6. Nakamoto K, Tokuyama S. Spinal lipocalin 2 as a factor in the development of central post-stroke pain. *Brain Res*. 2024;1838:148976. DOI: 10.1016/j.brainres.2024.148976.
7. Mueller JL, Stavely R, Guyer RA, Soos A, Bhawe S, Han C et al. Agrin Inhibition in enteric neural stem cells enhances their migration following colonic transplantation. *Stem Cells Transl Med*. 2024;13(5):490–504. DOI: 10.1093/stcltm/szae013.
8. Lu T, Huang C, Weng R, Wang Z, Sun H, Ma X. Enteric glial cells contribute to chronic stress-induced alterations in the intestinal microbiota and barrier in rats. *Heliyon*. 2024;10(3):e24899. DOI: 10.1016/j.heliyon.2024.e24899.
9. Almeida PP, Da Cruz BO, Thomasi B, Menezes AC, Brito ML, Costa NDS et al. Brazil nut-enriched diet modulates enteric glial cells and gut microbiota in an experimental model of chronic kidney disease. *J Am Nutr Assoc*. 2024;43(2):201–12. DOI: 10.1080/27697061.2023.2247057.
10. Holden JM, Wareham LK, Calkins DJ. Morphological and electrophysiological characterization of a novel displaced astrocyte in the mouse retina. *Glia*. 2024;72(7):1356–70. DOI: 10.1002/glia.24536.

11. Lopez IA, Ishiyama G, Acuna D, Ishiyama A. Otopetrin-2 immunolocalization in the human macula utricule. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2019;128(6_suppl):96S–102S. DOI: 10.1177/0003489419834952.
12. Wei JP, Zhao ZX, Zeng J, Shang FH, Hua L, Yang Y et al. Yigong Powder regulates CXCL12/CXCR4 signaling to reduce glutamate release and prevent cognitive decline in mouse model of aging. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. 2023;48(23):6483–91 (In Chinese). DOI: 10.19540/j.cnki.cjmm.20230811.702.
13. Wahid RM, Hassan NH, Samy W, Abdelhadi AA, Saadawy SF, Elsayed SF et al. Unraveling the hepatic stellate cells mediated mechanisms in aging's influence on liver fibrosis. *Sci Rep*. 2024;14(1):13473. DOI: 10.1038/s41598-024-63644-1.
14. Bandyopadhyay U, Sridhar S, Kaushik S, Kiffin R, Cuervo AM. Identification of regulators of chaperone-mediated autophagy. *Mol Cell*. 2010;39(4):535–47. DOI: 10.1016/j.molcel.2010.08.004.
15. Phillips CL, Faridounnia M, Armao D, Snider NT. Stability dynamics of neurofilament and GFAP networks and protein fragments. *Curr Opin Cell Biol*. 2023;85:102266. DOI: 10.1016/j.ccb.2023.102266.
16. Yang Y, Yu L, Zhu T, Xu S, He J, Mao N et al. Neuroprotective effects of Rehmannia glutinosa polysaccharide on chronic constant light (CCL)-induced oxidative stress and autophagic cell death via the AKT/mTOR pathway in mouse hippocampus and HT-22 cells. *Int J Biol Macromol*. 2024;261(Pt 2):129813. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2024.129813.
17. Michurina SV, Miroshnichenko SM, Serykh AE, Ishchenko IY, Letyagin AY, Zavjalov EL. Light-induced functional pinealectomy. Effect on the thymus of C57BL/6 mice. *Bull Exp Biol Med*. 2022;174(1):152–8. DOI: 10.1007/s10517-022-05665-2.
18. Verma V, Kumari R, Singaravel M. Chronic altered light-dark cycle differentially affects hippocampal CA1 and DG neuronal arborization in diurnal and nocturnal rodents. *Chronobiol Int*. 2022;39(5):665–77. DOI: 10.1080/07420528.2021.2023561.
19. Megha KB, Arathi A, Shikha S, Alka R, Ramya P, Mohanan PV. Significance of melatonin in the regulation of circadian rhythms and disease management. *Mol Neurobiol*. 2024;61(8):5541–71. DOI: 10.1007/s12035-024-03915-0.
20. Qin T, Feng D, Zhou B, Bai L, Yin Y. Melatonin suppresses LPS-induced oxidative stress in dendritic cells for inflammatory regulation via the Nrf2/HO-1 axis. *Antioxidants (Basel)*. 2022;11(10):2012. DOI: 10.3390/antiox11102012.
21. Abecia JA, Garrido C, Gave M, Garcia AI, López D, Luis S et al. Exogenous melatonin and male foetuses improve the quality of sheep colostrum. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*. 2020;104(5):1305–9. DOI: 10.1111/jpn.13362.
22. Agbaria S, Haim A, Fares F, Zubidat AE. Epigenetic modification in 4T1 mouse breast cancer model by artificial light at night and melatonin – the role of DNA-methyltransferase. *Chronobiol Int*. 2019;36(5):629–43. DOI: 10.1080/07420528.2019.1574265.
23. Rezzani R, Franco C, Hardeland R, Rodella LF. Thymus-pineal gland axis: revisiting its role in human life and ageing. *Int J Mol Sci*. 2020;21(22):8806. DOI: 10.3390/ijms21228806.
24. Günther HS, Henne S, Oehlmann J, Urban J, Pleizier D, Renavier N et al. GFAP and desmin expression in lymphatic tissues leads to difficulties in distinguishing between glial and stromal cells. *Sci Rep*. 2021;11(1):13322. DOI: 10.1038/s41598-021-92364-z.
25. Голубцова Н.Н., Богданов А.В., Гунин А.Г. Гендерные особенности содержания ламинов в фибробластах кожи человека при хронологическом старении. *Сибирский научный медицинский журнал*. 2019;39(4):71–77. DOI: 10.15372/SSMJ20190409.
Golubtsova NN, Bogdanov AV, Gunin AG. Gender features of lamina content in human skin fibroblasts in a process of chronological aging. *Sibirskiy nauchnyy meditsinskiy zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal*. 2019;39(4):71–77. DOI: 10.15372/SSMJ20190409.
26. Ivanova E, Matyushkin A, Sorokina A, Alexeeva S, Miroshkina I, Kachalov K et al. Low-affinity NMDA receptor antagonist hemantane in a topical formulation attenuates arthritis induced by Freund's Complete Adjuvant in rats. *Adv Pharm Bull*. 2024;14(1):241–52. DOI: 10.34172/apb.2024.002.
27. Сергеева Ю.А., Трофименко А.И., Федоренко Т.В., Гилевич И.В., Коломийцева Е.А., Каде А.Х. Влияние D-аспарагина на пролиферативную активность дермальных фибробластов человека. *Медицинский вестник Северного Кавказа*. 2020;15(3):360–363. DOI: 10.14300/mnnc.2020.15085.
Sergeeva YuA, Trofimenko AI, Fedorenko TV, Gilevich IV, Kolomiycева EA, Kade AH. Influence of d-asparagine on the proliferative activity of human dermal fibroblasts. *Medical News of the North Caucasus*. 2020;15(3):360–363 (In Russ.). DOI: 10.14300/mnnc.2020.15085.
28. Лузикова Е.М., Сергеева В.Е., Московский А.В., Сергеев П.В., Лукачев И.А., Московская О.И. Влияние фотопериода на серотонинергическую систему вилочковой железы и его роль в реализации эффектов экзогенного мелатонина. *Казанский медицинский журнал*. 2022;103(5):788–796. DOI 10.17816/KMJ2022-788.
Luzikova EM, Sergeeva VE, Moskovsky AV, Sergeev PV, Lukachev IA, Moskovskaya OI. The effect of the photoperiod on the serotonergic system of the thymus and its role in the implementation of the effects of exogenous melatonin. *Kazan Medical Journal*. 2022;103(5):788–796 (In Russ.). DOI 10.17816/KMJ2022-788.
29. Xiao SY, Liu YJ, Lu W, Sha ZW, Xu C, Yu ZH et al. Possible neuropathology of sleep disturbance linking to Alzheimer's disease: astrocytic and microglial roles. *Front Cell Neurosci*. 2022;16:875138. DOI: 10.3389/fncel.2022.875138.
30. Лузикова Е.М., Сергеева В.Е., Гималдинова Н.Е. Исследование влияния светового режима и мелатонина на интенсивность инволюции тимуса крыс, опосредованную серотонинсодержащими тучными клетками. *Acta Medica Eurasica*. 2023;2:60–72. DOI: 10.47026/2413-4864-2023-2-60-72.
Luzikova EM, Sergeeva VE, Gimaldinova NE. Investigation of the effect of light regime and melatonin on the intensity of thymus involution in rats mediated by serotonin-containing mast cells. *Acta Medica Eurasica*. 2023;2:60–72 (In Russ.). DOI: 10.47026/2413-4864-2023-2-60-72.
31. Цветкова Е.С., Романцова Т.И., Полуэктов М.Г., Рунова Г.Е., Глинкина И.В., Фадеев В.В. Значение мелатонина в регуляции метаболизма, пищевого поведения, сна и перспективы его применения при экзогенно-конституциональном ожирении.

- Ожирение и метаболизм. 2021;18(2):112–124. DOI: 10.14341/omet12279.
Tsvetkova ES, Romantsova TI, Poluektov MG, Runova GE, Glinkina IV, Fadeev VV. The importance of melatonin in the regulation of metabolism, eating behavior, sleep, and the prospects for the use of melatonin drugs for obesity treatment. *Obesity and metabolism.* 2021;18(2):112–124 (In Russ.). DOI: 10.14341/omet12279.
32. *Niles LP, Armstrong KJ, Rincón Castro LM, Dao CV, Sharma R, McMillan CR et al.* Neural stem cells express melatonin receptors and neurotrophic factors: colocalization of the MT1 receptor with neuronal and glial markers. *BMC Neurosci.* 2004;5:41. DOI: 10.1186/1471-2202-5-41.
33. *Yang YQ, Tiliwaerde M, Gao NN, Gu W, Zhang TT, Jin ZL.* GW117 induces anxiolytic effects by improving hippocampal functions. *Pharmacol Biochem Behav.* 2024;247:173927. DOI: 10.1016/j.pbb.2024.173927. Epub ahead of print.
34. *Lu YS, Chen J, He XR, Yang SL, Ma BJ, Yu J et al.* Perfluorooctane sulfonate (PFOS) and benzo[a]pyrene (BaP) synergistically induce neurotoxicity in C6 rat glioma cells via the activation of neurotransmitter and Cyp1a1-mediated steroid hormone synthesis pathways. *Food Chem Toxicol.* 2024;193:115058. DOI: 10.1016/j.fct.2024.115058.
35. *Куклина Е.М., Глебездина Н.С.* Механизмы взаимодействия мелатонина с лимфоцитами. Вестник Пермского Университета. Серия: Биология. 2023;2:195–204. DOI: 10.17072/1994-9952-2023-2-195-204.
Kuklina EM, Glebezдина NS. Mechanisms of interaction between melatonin with lymphocytes. *Bulletin of Perm University. Biology.* 2023;2:195–204. DOI: 10.17072/1994-9952-2023-2-195-204.
36. *Gao X, Sun H, Wei Y, Niu J, Hao S, Sun H et al.* Protective effect of melatonin against metabolic disorders and neuropsychiatric injuries in type 2 diabetes mellitus mice. *Phytomedicine.* 2024;131:155805. DOI: 10.1016/j.phymed.2024.155805.
37. *Zemniçak AB, Ribeiro RT, Pinheiro CV, de Azevedo Cunha S, Tavares TQ, Castro ET et al.* In vivo intracerebral administration of α -ketoisocaproic acid to neonate rats disrupts brain redox homeostasis and promotes neuronal death, glial reactivity, and myelination injury. *Mol Neurobiol.* 2024;61(5):2496–513. DOI: 10.1007/s12035-023-03718-9.
38. *Labunets I, Rodnichenko A, Savosko S, Pivneva T.* Reaction of different cell types of the brain on neurotoxin cuprizone and hormone melatonin treatment in young and aging mice. *Front Cell Neurosci.* 2023;17:1131130. DOI: 10.3389/fncel.2023.1131130.

Информация об авторах

Елена Михайловна Лузикова – кандидат биологических наук, доцент кафедры общей и клинической морфологии и судебной медицины Чувашского государственного университета имени И.Н. Ульянова.

Александр Владимирович Московский – доктор медицинских наук, профессор кафедры ортопедической стоматологии и ортодонтии Чувашского государственного университета имени И.Н. Ульянова.

Юрий Николаевич Уруков – доктор медицинских наук, заведующий кафедрой ортопедической стоматологии и ортодонтии Чувашского государственного университета имени И.Н. Ульянова.

Author information

Elena M. Luzikova – Cand. Sci. (Biol.), Associate Professor, Department of General and Clinical Morphology and Forensic Medicine, I.N. Ulyanov Chuvash State University.
<https://orcid.org/0000-0002-1217-0985>

Alexander V. Moskovsky – Dr. Sci. (Med.), Professor, Department of Orthopedic Dentistry and Orthodontics, I.N. Ulyanov Chuvash State University.
<https://orcid.org/0000-0003-3043-9703>

Yuri N. Urukov – Dr. Sci. (Med.), Head of the Department of Orthopedic Dentistry and Orthodontics, I.N. Ulyanov Chuvash State University.
<https://orcid.org/0000-0003-4220-7731>