

ВЛИЯНИЕ АЛЮМИНИЙ-, КРЕМНИЙСОДЕРЖАЩЕГО ЭНТЕРОСОРБЕНТА НА КЛЕТОЧНЫЙ СОСТАВ ТИМУСА МЫШЕЙ, СОДЕРЖАВШИХСЯ ПРИ ДВУХНЕДЕЛЬНОМ КРУГЛОСУТОЧНОМ ОСВЕЩЕНИИ

Мирошниченко С.М.^{1,2},
Мичурина С.В.¹,
Ищенко И.Ю.¹,
Рачковская Л.Н.¹,
Серых А.Е.^{1,3},
Рачковский Э.Э.¹,
Летягин А.Ю.¹

¹ Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии – филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН» (630060, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2, Россия)

² Научно-исследовательский институт биохимии – филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» (630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2, Россия)

³ Научно-исследовательский институт экспериментальной и клинической медицины – филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» (630060, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2, Россия)

Автор, ответственный за переписку:
Мирошниченко
Светлана Михайловна,
e-mail: svmiro@yandex.ru

РЕЗЮМЕ

Обоснование. Непрерывное освещение способствует развитию десинхронизации, что является стрессом для организма. Как следствие нарушается нормальная работа иммунной системы, что в свою очередь способно сдвигать физиологическое равновесие в сторону патологии и эндотоксикоза. Актуальна разработка инновационных лекарственных средств, в основе которых находится сорбентная матрица, которая может быть модифицирована биологически активными молекулами, пролонгированно покидающими поверхность сорбента. При этом сорбент сохраняет свойства детоксиканта, фиксируя на поверхности токсические агенты и выводя их из организма, что способствует восстановлению внутренней среды и нормализует общую реактивность организма в экстремальных условиях.

Цель исследования. Изучить влияние алюминий-, кремнийсодержащего энтеросорбента (на основе оксида алюминия и полидиметилсилоксана) на клеточный состав тимуса и распределение тимоцитов в органе по фазам клеточного цикла у мышей C57Bl/6, содержавшихся при круглосуточном освещении.

Материалы и методы. Животные получали сорбент (0,665 г на 1 кг веса тела в 200 мкл дистиллированной воды) через внутрижелудочный зонд 1 раз в день в течение 14 суток на фоне непрерывного освещения. Контролем служили интактные мыши и животные плацебо. Используя метод проточной цитометрии, оценивали процентное содержание CD3^{hi}- и CD3^{low}-лимфоцитов тимуса, соотношение CD3^{low}/CD3^{hi}, жизнеспособность и распределение клеток по фазам клеточного цикла.

Результаты. Круглосуточное освещение угнетало процессы дифференцировки и созревания молодых лимфоцитов CD3^{low} в зрелые формы CD3^{hi}, снижало пролиферацию эпителиальных клеток тимуса, активировало апоптоз лимфоцитов и эпителиальных клеток в органе. Введение сорбента восстанавливало содержание и жизнеспособность молодых CD3^{low}-лимфоцитов и способствовало сохранению жизнеспособности и пролиферации эпителиальных клеток тимуса.

Заключение. Применение энтеросорбента на основе оксида алюминия и полидиметилсилоксана в условиях непрерывного освещения способствует сохранению функциональной активности тимуса, препятствуя его инволюции, и целесообразно на фоне нарушения суточных ритмов режима освещения.

Ключевые слова: непрерывное двухнедельное освещение, алюминий-, кремнийсодержащий сорбент, CD3^{hi}-лимфоциты, CD3^{low}-лимфоциты, эпителиальные клетки тимуса, клеточный цикл, апоптоз, стресс

Для цитирования: Мирошниченко С.М., Мичурина С.В., Ищенко И.Ю., Рачковская Л.Н., Серых А.Е., Рачковский Э.Э., Летягин А.Ю. Влияние алюминий-, кремнийсодержащего энтеросорбента на клеточный состав тимуса мышей, содержавшихся при двухнедельном круглосуточном освещении. *Acta biomedica scientifica*. 2024; 9(3): 239-248. doi: 10.29413/ABS.2024-9.3.24

Статья поступила: 05.07.2023

Статья принята: 24.05.2024

Статья опубликована: 15.07.2024

THE EFFECT OF ALUMINUM- AND SILICON-CONTAINING ENTEROSORBENT ON THE THYMIC CELLULAR COMPOSITION IN MICE KEPT UNDER TWO-WEEK ALL-NIGHT LIGHTING

Miroshnichenko S.M.^{1,2},
Michurina S.V.¹,
Ishchenko I.Yu.¹,
Rachkovskaya L.N.¹,
Serykh A.E.^{1,3},
Rachkovsky E.E.¹,
Letyagin A.Yu.¹

¹ Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology – Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences (Timakova str. 2, Novosibirsk 630060, Russian Federation)

² Institute of Biochemistry, Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine (Timakova str. 2, Novosibirsk 630117, Russian Federation)

³ Research Institute of Experimental and Clinical Medicine, Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine (Timakova str. 2, Novosibirsk 630060, Russian Federation)

Corresponding author:
Svetlana M. Miroshnichenko,
e-mail: svmiro@yandex.ru

ABSTRACT

Background. Continuous lighting contributes to the development of desynchronization, which is stressful for the body. As a result, the normal functioning of the immune system is disrupted, which in turn can shift the physiological balance towards pathology and endotoxemia. It is relevant to develop innovative drugs based on a sorbent matrix, which can be modified with biologically active molecules that extendedly leave the sorbent surface. At the same time, the sorbent retains the properties of a detoxifier, fixing toxic agents on the surface and removing them from the body, which helps restore the internal environment and normalizes the overall reactivity of the body in extreme conditions.

The aim. To study the effect of aluminum- and silicon-containing enterosorbent (based on aluminum oxide and polydimethylsiloxane) on the cellular composition of the thymus and the distribution of thymocytes in the organ according to the cell cycling state in C57Bl/6 mice kept under the all-night lighting.

Materials and methods. Animals received sorbent (0.665 g per 1 kg of body weight in 200 µl of distilled water) through an intragastric tube once a day for 14 days against the background of continuous lighting. Intact mice and placebo animals composed control group. We used flow cytometry to assess the percentage of CD3^{hi} and CD3^{low} lymphocytes of the thymus, the CD3^{low}/CD3^{hi} ratio, viability and distribution of cells across according to the cell cycling state.

Results. Continuous lighting inhibited the differentiation and maturation of young CD3^{low} lymphocytes into mature forms of CD3^{hi}, reduced the proliferation of thymic epithelial cells, and activated apoptosis of lymphocytes and epithelial cells in the organ. The introduction of the sorbent restored the content and viability of young CD3^{low} lymphocytes and contributed to the preservation of the viability and proliferation of thymic epithelial cells.

Conclusion. Using an enterosorbent based on aluminum oxide and polydimethylsiloxane under conditions of continuous lighting helps maintain the functional activity of the thymus, preventing its involution, and is advisable against the background of circadian disruption.

Key words: continuous two-week lighting, aluminum- and silicon-containing sorbent, CD3^{hi} lymphocytes, CD3^{low} lymphocytes, thymic epithelial cells, cell cycle, apoptosis, stress

Received: 05.07.2023

Accepted: 24.05.2024

Published: 15.07.2024

For citation: Miroshnichenko S.M., Michurina S.V., Ishchenko I.Yu., Rachkovskaya L.N., Serykh A.E., Rachkovsky E.E., Letyagin A.Yu. The effect of aluminum- and silicon-containing enterosorbent on the thymic cellular composition in mice kept under two-week all-night lighting. *Acta biomedica scientifica*. 2024; 9(3): 239-248. doi: 10.29413/ABS.2024-9.3.24

ВВЕДЕНИЕ

Циркадная десинхрония получает всё большее распространение в связи с изменившимися условиями в современном обществе, работающем круглосуточно, включая воздействие искусственного освещения, сменную работу и смену часовых поясов. Подавление синтеза мелатонина в результате длительного пребывания в условиях непрерывного освещения приводит к развитию светоиндуцированного функционального десинхроноза, что является стрессом для организма [1]. Несбалансированный ответ на сильное или длительное стрессовое воздействие способен сдвинуть физиологическое равновесие в сторону патологии и развития эндотоксикоза. Показано, что снижение или же блокада синтеза мелатонина сопровождают развитие многочисленных распространённых патологий – от старения и сахарного диабета 2-го типа до неврологических расстройств [2, 3]. Нейрогуморальным механизмам принадлежит основная роль в поддержании функциональной и биохимической устойчивости организма в изменяющихся условиях окружающей среды, а основой адаптационного ответа на стресс считают активность гипоталамо-надпочечниковой оси. Длительное и/или сильное воздействие активирует секрецию кортизола и кортикостерона надпочечниками, которые оказывают своё метаболическое влияние на клетки и органы, вызывая в том числе и снижение функциональной активности тимуса [4]. Основой инволюции вилочковой железы считают избыточный апоптоз и ингибирование пролиферации субпопуляции кортизол-чувствительных лимфоцитов [5].

Тимус является центральным органом лимфо-/иммунопоза, в котором пролиферация и селективный отбор антиген-специфичных и толерантных к антигенам хозяина лимфоцитов обеспечивает миграцию зрелых и наивных Т-клеток в кровяное русло и периферические лимфоидные органы, где Т-клетки обеспечивают как клеточный, так и гуморальный иммунный ответ, активируя В-лимфоциты. Инволюция тимуса может способствовать риску и рецидивам рака, росту восприимчивости к инфекциям [6], а потеря иммунокомпетентности может привести к развитию широкого спектра иммунных и тяжёлых инфекционных заболеваний, развитию ожирения и диабета [5, 7]. Старение и жировая дистрофия тимуса становятся фактором поддержания воспаления и развития болезней «старения» – артрита, сердечно-сосудистых заболеваний [8].

В связи с вышесказанным существует клиническая потребность в нетоксичных и доступных средствах, способных снизить воздействие стресса на организм. Научные исследования академика Ю.И. Бородина и его учеников показали, что методы сорбентного лечения напрямую связаны с возможностью преодоления синдрома эндотоксикоза. Введённый энтерально сорбент способен влиять на физиологические константы организма, не связанные даже напрямую с процессом энтеросорбции. При этом сорбент выступает как пусковой механизм каскада реакций от местного до организменного уровня. Наблюдается функциональная аналогия в действии

сорбирующего агента и регионарного лимфатического аппарата. В обоих случаях имеют место дренаж и детоксикация патологического очага [9, 10].

В настоящее время интерес исследователей направлен на разработку инновационных лекарственных средств, в основе которых находится сорбентная матрица, модифицированная биологически активными молекулами, пролонгированно покидающими поверхность сорбента. Сам сорбент (как энтеросорбент) сохраняет свойства детоксиканта, фиксируя на своей поверхности широкий класс веществ – от низкомолекулярных до высокомолекулярных, находящихся в избытке при различных заболеваниях и отравлениях (например, бактериальные токсины, билирубин, катехоламины, кинин, желчные кислоты), и выводя их из организма. С этой точки зрения перспективным является гидрофильно-гидрофобный алюминий-, кремнийсодержащий сорбент (энтеросорбент) на основе оксида алюминия и полидиметилсилоксана – $Al_2O_3@ПДМС$ с объёмом пор $0,2 \text{ см}^3/\text{г}$, способный связывать молекулы разного заряда и разного размера – от низко- до высокомолекулярных. Адсорбционная активность, например по отношению к низкомолекулярному метиленовому голубому, составляет 10 мг/г ; и он поглощает золотистого стафилококка из водной среды на 25 % от исходного их содержания. Этот сорбент, использованный в качестве носителя для лития, прошёл успешно доклинические исследования в составе лекарственного средства в рамках государственного задания. Сам энтеросорбент безопасен, относится к IV классу опасности. Этот легко сыпучий порошок белого цвета с размером частиц $0,04 \text{ мм}$ и величиной удельной поверхности $100 \text{ м}^2/\text{г}$ может быть использован в качестве составной части лекарственных средств. Представляет интерес исследование его биологических свойств по отношению к легко уязвимым клеткам тимуса в условиях нарушения естественных биоритмов смены дня и ночи.

Целью данной работы явилось изучение влияния алюминий-, кремнийсодержащего энтеросорбента $Al_2O_3@ПДМС$ на клеточный состав тимуса и распределение тимоцитов в органе по фазам клеточного цикла у мышей C57Bl/6, содержащихся при круглосуточном освещении.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование проводили на базе ЦКП «SPF-виварий» ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН» (ИЦИГ СО РАН) (RFMEFI61914X0005 и RFMEFI62114X0010) и выполняли в соответствии с требованиями Директивы 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза о защите животных, используемых в научных целях, и правилами надлежащей лабораторной практики. Экспериментальный протокол одобрен этическим комитетом Научно-исследовательского института клинической и экспериментальной лимфологии (НИИКЭЛ) – филиала ИЦИГ СО РАН (протокол № 128 от 15.03.2017). Самцы мышей линии C57Bl/6 в возрасте 10–12 недель находились

в контролируемых барьерных помещениях с предоставлением свободного доступа к воде и пище.

Часть мышей содержались в условиях круглосуточного освещения (КО; $n = 6$), создаваемого лампами дневного света Philips 18 Вт (Philips, Нидерланды; фотопериод свет : темнота 24 : 0 ч) в течение 14 суток. Второй группе животных (КО + Сорбент; $n = 6$) ежедневно в течение 14 суток на фоне КО внутрижелудочно вводили сорбентную композицию из оксида алюминия и полиметилсилоксана (0,665 г на 1 кг веса тела в 200 мкл дистиллированной воды). В качестве группы плацебо были выбраны животные, ежедневно получавшие внутрижелудочно по 200 мкл дистиллированной воды на фоне постоянного освещения.

Третью группу составили интактные мыши (Контроль; $n = 6$), содержавшиеся при стандартном режиме освещения и питания (фотопериод свет : темнота 14 : 10 ч).

Из эксперимента животных выводили методом краниоцервикальной дислокации, забирали тимус и готовили суспензию клеток, которую исследовали на проточном цитофлуориметре CytoFlex S100 (Beckman Coulter, США).

Тимус гомогенизировали в холодном фосфатно-солевом буфере (PBS, phosphate-buffered saline) в стеклянном гомогенизаторе при 4 °C. Тимоциты осаждали центрифугированием (300 g, 5 мин) и использовали для окрашивания моноклональными антителами CD3e-APC (BioLegend, США) с целью определения молодых $CD3^{low}$ - и зрелых $CD3^{hi}$ -лимфоцитов. Для анализа распределения клеток по фазам клеточного цикла клетки тимуса (5×10^6) фиксировали в холодном 70%-м этаноле в течение 24 ч [11].

Пробы клеток (2×10^6) в 100 мкл окрашивали флуоресцентно мечеными антителами в течение 30 мин при комнатной температуре в темноте. Затем их дважды отмывали PBS и анализировали на проточном цитофлуориметре. Фиксированные 70%-м этанолом клетки центрифугировали (300 g, 7 мин), отмывали PBS и в течение 5 мин инкубировали в гипотоническом буфере экстракции для удаления низкомолекулярной ДНК с целью определения пика субдиплоидов. Отмытые буфером клетки инкубировали (30 мин, комнатная температура, темнота) в буфере окраски, содержащем 50 µg/mL йодида пропидия (PI, propidium iodide; Sigma-Aldrich, США) и 200 µg/mL РНКазы-А (Invitrogen, США). Флуоресценцию PI определяли на проточном цитофлуориметре ($\lambda_{Em} = 670$ нм). Оценивали количество клеток с различным содержанием ДНК в фазах клеточного цикла: SubG1, G0/G1, S, G2/M.

Статистическую обработку полученных результатов проводили в программе Statistica 12.0 (StatSoft Inc., США). Определяли значения медианы, первого и третьего квартилей. Статистическую значимость различий сравниваемых величин между группами КО + Сорбент и КО, КО + Сорбент и Контроль вычисляли с помощью непараметрического *U*-критерия Манна – Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

1. Влияние приёма сорбентной композиции на численную плотность $CD3^{low}$ - и $CD3^{hi}$ -лимфоцитов у животных с круглосуточным освещением

В предыдущей работе [12] было установлено, что постоянное освещение мышей в течение 14 суток привело к статистически значимому уменьшению относительного количества как молодых $CD3^{low}$ ($p = 0,0051$), так и зрелых $CD3^{hi}$ ($p = 0,0374$) Т-лимфоцитов тимуса по сравнению с контролем. При этом статистически значимо снизилось соотношение $CD3^{low}/CD3^{hi}$ ($p = 0,0131$). Развития акцидентальной инволюции тимуса у мышей с КО в нашем исследовании зарегистрировано не было. Внутрижелудочное введение энтеросорбента животным на фоне КО нормализовало относительное количество молодых $CD3^{low}$ -timoцитов, увеличив их содержание до 46,70 (45,88; 47,08) % (у интактных животных – 43,40 (41,85; 44,33) %). В результате значительно возросло соотношение $CD3^{low}/CD3^{hi}$ (по сравнению с контролем $p = 0,0202$; по сравнению с КО $p = 0,0051$) (рис. 1).

Вклад в такие перестройки может вносить как нарушение суточных биоритмов пролиферации и миграции клеток иммунной системы при изменённом световом режиме, так и длительный стресс, приводящий к угнетению пролиферации незрелых лимфоцитов в корковом веществе тимуса и к их повышенному апоптозу.

Для определения влияния сорбента на выживаемость и пролиферацию клеток тимуса в условиях 14-дневного круглосуточного освещения мы провели анализ клеточного цикла для всех клеток вилочковой железы.

2. Влияние введения сорбентной композиции на клеточный цикл клеток тимуса в условиях круглосуточного освещения

Анализ клеточного цикла всей популяции клеток тимуса мышей после КО показал значительное снижение относительного числа клеток в S-фазе до 3,4 (2,3; 6,8) % по сравнению с контролем – 7,3 (7,0; 11,1) % ($p = 0,0367$), более чем трёхкратное увеличение доли клеток в стадии апоптоза до 2,2 (1,8; 3,2) % по сравнению с контролем – 0,7 (0,63; 0,73) % ($p = 0,01997$).

Введение сорбента животным на фоне КО нормализовало клеточный цикл, увеличив процентное содержание клеток в S-фазе до 7,45 (6,5; 12,75) % и снизив количество клеток в стадии апоптоза до уровня контроля. Таким образом, сорбент поддерживает повышенный адаптационный уровень пролиферации клеток тимуса и предохраняет клетки от апоптоза в условиях длительного круглосуточного освещения.

Для более полного анализа пролиферации и жизнеспособности клеточных элементов тимуса на гистограммах проточной цитометрии все клетки были разделены на 3 группы (3 гейта – PLym, P2Lym, P3big) в зависимости от размера и скорректированы на клеточный цикл (рис. 2). Таким образом, гейт PLym был сформирован самыми мелкими клетками, часть из которых нахо-

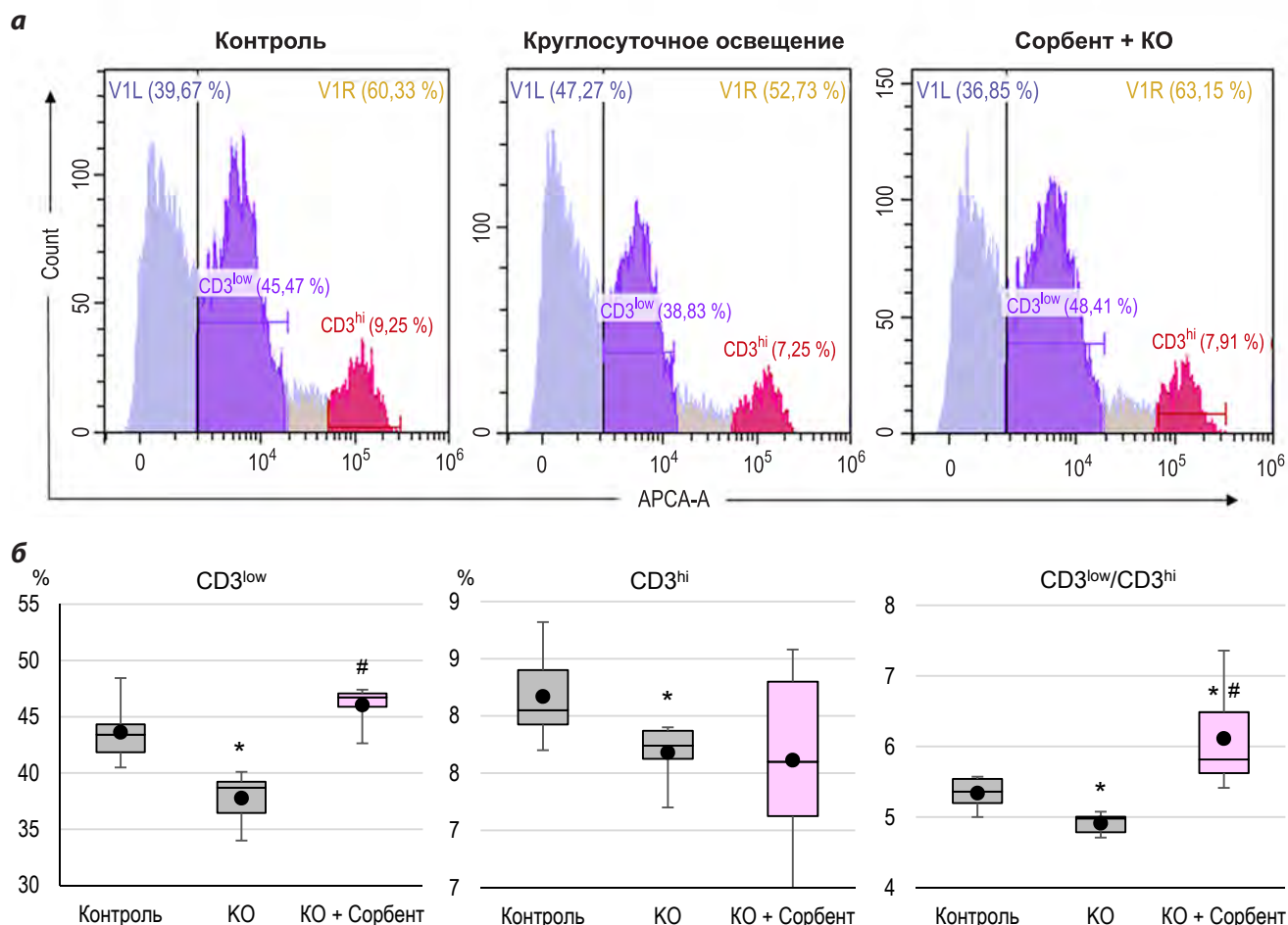


РИС. 1.

Тимус мышей линии C57Bl/6, получавших сорбент, на фоне двухнедельного круглосуточного освещения (КО): **а** – гистограммы распределения CD3^{low}- и CD3^{hi}-лимфоцитов; **б** – относительное количество CD3^{low}- и CD3^{hi}-лимфоцитов и соотношение CD3^{low}/CD3^{hi}; * – по сравнению с контролем; # – по сравнению с КО ($p < 0,05$)

FIG. 1.

Thymus of C57Bl/6 mice treated with sorbent against the background of continuous lighting (KO): **а** – histograms of distribution of CD3^{low} and CD3^{hi} lymphocytes; **б** – relative number of CD3^{low} and CD3^{hi} lymphocytes and CD3^{low}/CD3^{hi} ratio; * – compared to the control; # – compared to KO ($p < 0.05$)

дятся в фазах активного клеточного цикла (S + G2/M). Юные CD3^{low}-лимфоциты содержались преимущественно в этом гейте. В гейте P2Lym оказались зрелые неделяющиеся лимфоциты, находящиеся в стадии G0/G1. Самые крупные клетки, большая часть которых активно делилась, составили гейт P3big. На рисунке 2 представлен клеточный цикл каждого из гейтов.

Гейт самых мелких клеток PLym, содержащий CD3^{low}-лимфоциты, имел наименьшее количество клеток по сравнению с другими группами; число клеток в фазе S составило 6,8 (6,28; 7,1) %, клеток на стадии апоптоза – 2,2 (1,5; 2,75) % у контрольных животных. Круглосуточное освещение ингибировало фазу S, в результате чего относительное число клеточных элементов снизилось до 6,05 (5,55; 6,10) %, а количество клеток гейта PLym в состоянии апоптоза статистически значимо возросло до 11,65 (9,05; 13,28) % ($p = 0,0051$). Введение сорбента на фоне КО способствовало восстановлению пролиферации лимфоцитов тимуса и повышению их жизнеспособности, в результате чего возросло относительное содержа-

ние клеточных элементов в фазе S до 8,85 (7,75; 11,75) % и снизилось процентное содержание клеток в стадии апоптоза до 4,5 (3,4; 4,85) % ($p = 0,0065$).

Из рисунка 2 можно увидеть, что длительное непрерывное освещение ингибировало относительное количество Т-лимфоцитов (гейт PLym) в фазе S, но не повлияло на содержание в фазе G2/M, т. е. по сути произошло торможение пролиферации (остаточная пролиферация). Сорбент же на фоне КО вызвал существенный рост числа клеток в обеих фазах S и G2/M (фаза G2/M в контроле – 0,85 (0,73; 1,05) %, в группе КО – 1,05 (0,63; 1,25) %, в группе КО + Сорбент – 1,7 (1,23; 2,63) %. Такие изменения, возможно, связаны с адаптационным ответом на стрессорное воздействие. Широкий разброс данных в присутствии сорбента косвенно свидетельствует о том, что его действие в данном случае не прямое и не направлено на конкретную мишень, однако помогает организму остаться на стадии адаптации и не сползая на стадию истощения, сорбируя и удаляя избыточное количество высокоактивных веществ.

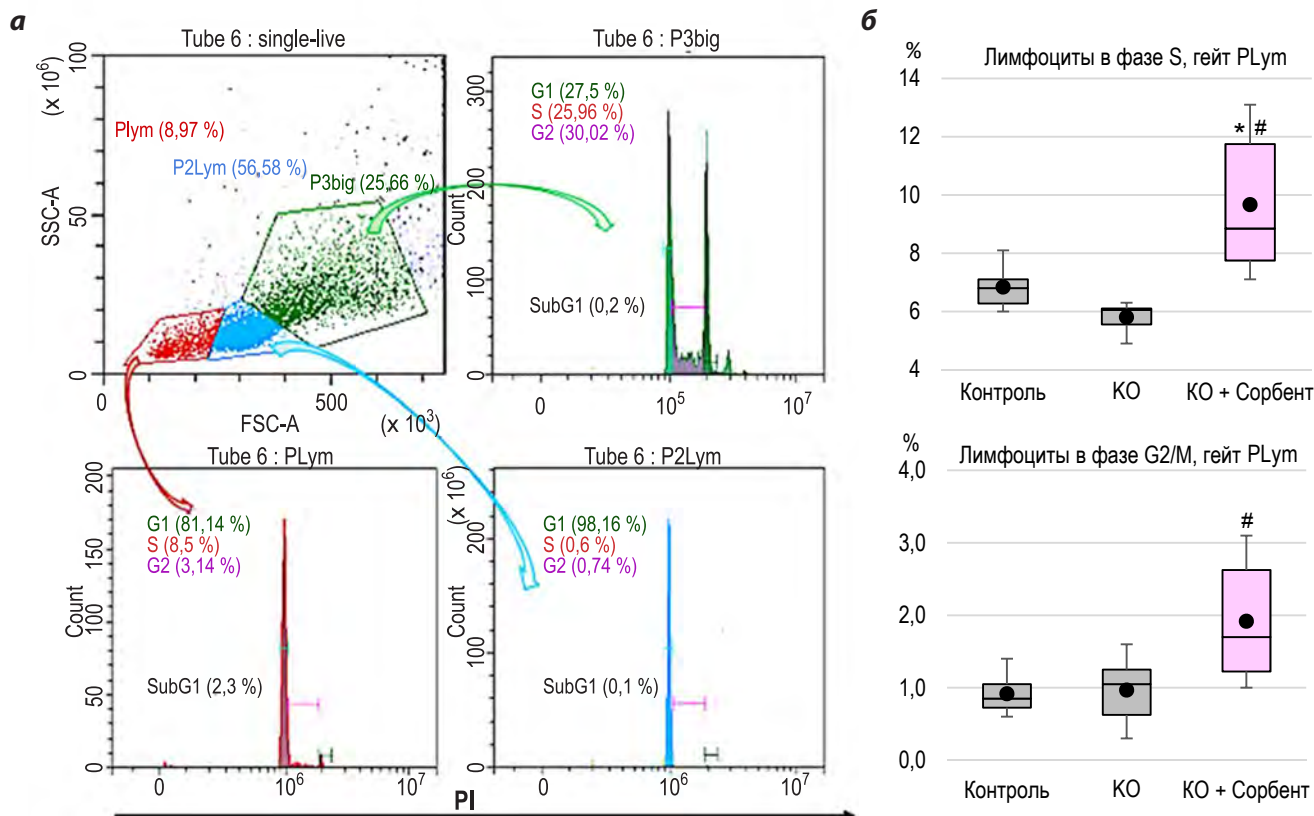


РИС. 2.

а – гистограммы проточной цитометрии клеточного цикла клеток тимуса мышей линии C57Bl/6: гейтирование клеток тимуса по размеру на гистограмме в координатах SSC/FSC; гистограммы клеточного цикла представлены для каждого выделенного региона клеток тимуса (показаны стрелками); по оси ординат – количество клеток; по оси абсцисс – интенсивность флуоресценции пропидия иодида. **б** – гистограммы процентного содержания лимфоцитов гейта PLym в стадиях клеточного цикла S и G2/M; * – по сравнению с контролем; # – по сравнению с KO ($p < 0,05$)

FIG. 2.

а – flow cytometry histograms of the thymus cell cycle of C57Bl/6 mice: gating the thymus cells by size on the histogram in SSC/FSC coordinates; cell cycle histograms are presented for each selected region of thymus cells (shown by arrows); ordinate axis – the number of cells; abscissa axis – the fluorescence intensity of propidium iodide. **б** – histograms of the percentage of PLym gate lymphocytes in the S and G2/M cell cycle stages; * – compared to the control, # – compared to continuous lighting (KO) group ($p < 0.05$)

3. Влияние сорбентной композиции на жизнеспособность и пролиферацию эпителиальных клеток тимуса на фоне непрерывного освещения

Пролиферация, дифференцировка и развитие иммунотолерантных к хозяину лимфоцитов с широким набором TSR-антигенов происходит в тесном контакте с эпителиальными клетками тимуса. При этом в медуллярных нишах происходит отрицательная селекция Т-лимфоцитов за счёт экспрессии на поверхности молекул МНС-I (major histocompatibility complex) и МНС-II, а кортикальные эпителиальные клетки отвечают за положительную селекцию. Поддержание кортикальных и медуллярных эпителиальных ниш тимуса обеспечивается предшественниками эпителиальных клеток с долгосрочным обновлением и высокой скоростью пролиферации и дифференцировки с расчётным временем замены от одной до двух недель с первых недель жизни. Поддержание эпителия мозгового вещества тимуса

у взрослых обеспечивается эпителиальными предшественниками, имеющими более низкие показатели самообновления, но всё ещё сохраняющими высокую скорость пролиферации [13].

В нашем исследовании пролиферативный потенциал клеток гейта P3big оказался значительно более высоким, чем для клеток гейта PLym или P2Lym. Клеточные элементы группы P3big более крупные и могут быть макрофагами, дендритными клетками, эпителиальными клетками, которые составляют строму тимуса и обеспечивают соответствующее микроокружение для развивающихся лимфоцитов. Высокая скорость пролиферации указывает на то, что, вероятнее всего, эти клеточные элементы и есть эпителиальные клетки, являющиеся основными клетками ниш тимуса. Круглосуточное освещение негативно повлияло на строму органа, статистически значимо снизив численную плотность эпителиальных клеток в фазе S до 26,55 (19,40; 27,55)% по сравнению с контролем – 32,50 (31,68; 33,10)% ($p = 0,0202$). Введе-

ние сорбента на фоне КО нормализовало пролиферацию эпителиальных клеток тимуса, восстановив их процентное количество в фазе S до 31,70 (30,95; 32,83) % (рис. 3). Содержание эпителиальных клеток в фазе G2/M статистически значимо не изменилось по сравнению с остальными группами животных. Длительное и непрерывное освещение привело к повышению содержания эпителиальных клеток на стадии апоптоза до 0,9 (0,73; 1,18) % ($p = 0,0051$). Введение сорбента на фоне круглосуточного освещения способствовало снижению апоптоза до уровня контроля (0,23 (0,22; 0,29) %; $p = 0,0051$).

Следовательно, применение сорбента на фоне длительного воздействия непрерывного освещения целесообразно, поскольку сорбент поддерживает самообновление эпителиальных клеток тимуса, сохраняя высокую скорость пролиферации эпителиальных клеток и снижая апоптоз до значений интактных животных (рис. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты настоящего исследования показали связь между длительным нарушением суточных ритмов, нарушением функционирования тимуса и нормализующей ролью сорбента для поддержания пролиферации и сохранения жизнеспособности ранних предшественников Т-лимфоцитов и эпителиальных клеток ниш тимуса. Снижение сопротивляемости организма при любом стресс-воздействии, в частности при КО, связывают с недостаточной функциональной активностью тимуса. Ранее нами было показано, что блокада синтеза мелатонина у мышей при постоянном освещении угнетает процессы дифференцировки и созревания молодых лимфоцитов CD3^{low} в зрелые формы CD3^{hi}, приводит к усилению апоптоза Т-лимфоцитов в тимусе и, как следствие, к лейкопении [12]. В этих условиях происходит активация гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой (ГГН)

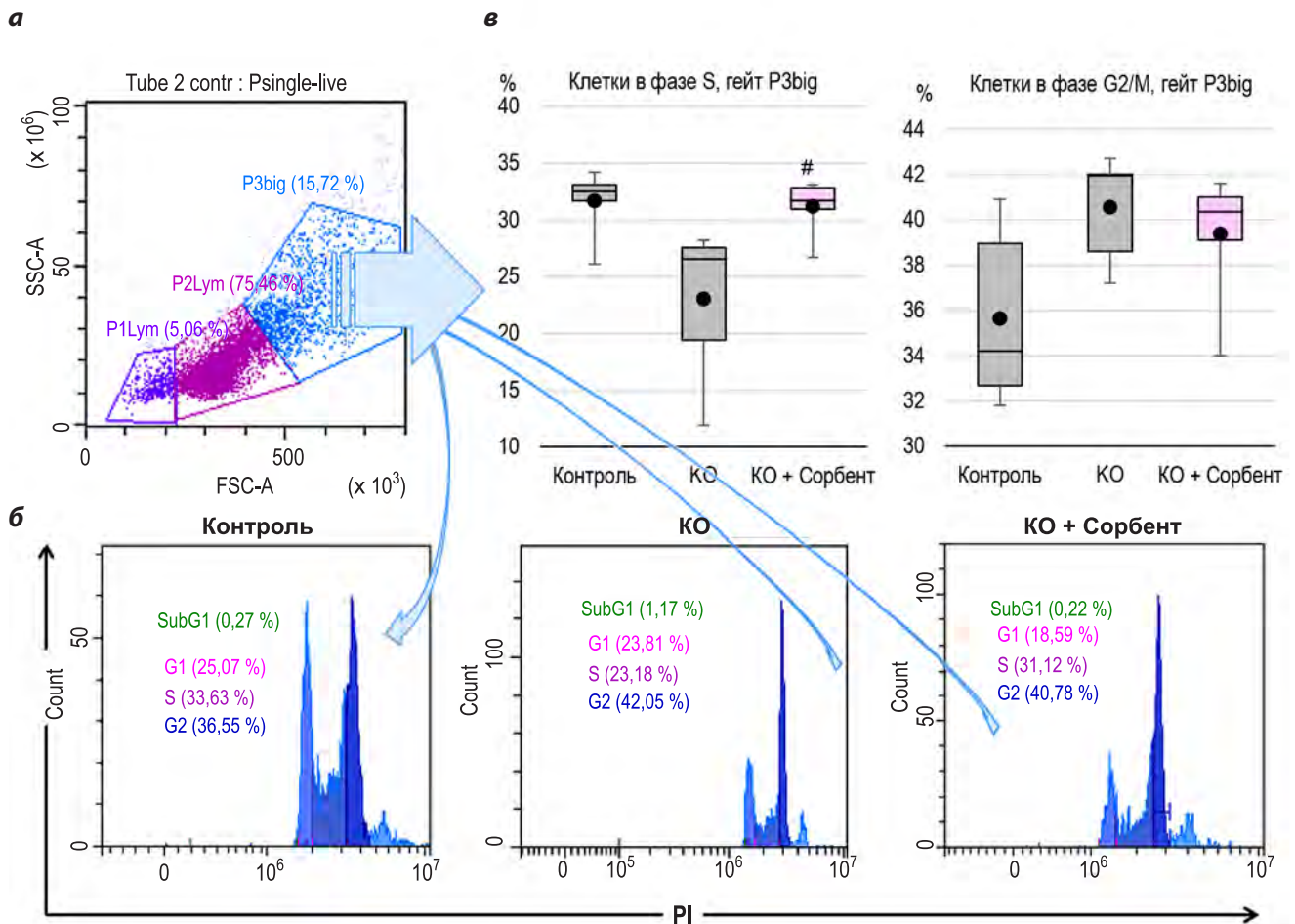


РИС. 3.
Гистограммы проточной цитометрии: **а** – гистограмма распределения клеток тимуса в координатах SSC/FSC, выделен гейт P3big; **б** – гистограммы распределения клеток гейта P3big по фазам клеточного цикла: по оси ординат – количество клеток, по оси абсцисс – пропидий йодид; **в** – графики относительного количества клеток гейта P3big в стадиях клеточного цикла S и G2/M: * – по сравнению с контролем, # – по сравнению с КО ($p < 0,05$)

FIG. 3.
Flow cytometry histograms: **а** – histogram of distribution of thymus cells in FSC/FSC coordinates, P3big gate is highlighted; **б** – histograms of distribution of P3big gate cells by phases of the cell cycle: ordinate axis – the number of cells, abscissa axis – propidium iodide; **в** – graphs of the relative number of P3big gate cells in the S and G2/M cell cycle stages: * – compared to the control, # – compared to continuous lighting (KO) group ($p < 0,05$)

оси как часть ответа на стресс, при котором гормоны гипофиза стимулируют кору надпочечника к высвобождению глюкокортикоидов, включая кортизол. Избыток кортизола вызывает апоптоз кортизол-чувствительных ранних лимфоцитов, что приводит к недостаточности Т-клеточного иммунитета. Это влияние кортизола считают драйвером инволюции тимуса [4, 5, 14]. Однако длительное непрерывное освещение затронуло не только снижение пролиферативной активности и апоптоз молодых CD3^{low}-лимфоцитов, но и снижение пролиферации эпителиальных клеток, являющихся основой как кортикальной, так и медуллярной ниш, важных для поддержания пролиферации и селекции Т-лимфоцитов. Применение сорбционной терапии на фоне круглосуточного освещения повлияло положительно на указанные параметры. Возможным защитным механизмом использования сорбента может быть как сорбция и удаление избытка кортизола, так и более глубокое воздействие, опосредованное состоянием и активностью кишечной микрофлоры. Ранее проведённые работы показали, что применение углерод-минерального сорбента СУМС-1 (на основе оксида алюминия) увеличивает количество ворсинок эпителия кишечника, нормализуя состояние микрофлоры [15]. Было показано, что у микробов существует тесная связь с осью ГГН [16]. Вмешательство в микробиоту кишечника может существенно повлиять на лечение заболеваний, связанных со стрессом. Стресс вызывает изменения в гормонах ГГН оси в сторону повышения кортизола у безмикробных мышей [17]. Кроме того, кишечные микробы регулируют метаболизм триптофана, продуцируют дофамин, γ-аминомасляную кислоту, гистамин и ацетилхолин, влияющие на функцию центральной нервной системы и стабильность оси ГГН [18]. С другой стороны, сам стресс может негативно влиять на микробиом кишечника, угнетая жизнедеятельность микробов, меняя их секреторируемый профиль [19]. По результатам данного исследования можно полагать, что сорбент, созданный на основе оксида алюминия и полиметилсилоксана, сорбируя оксиданты, токсичные метаболиты, оказывая детоксикационный и лимфодренажный эффект, способствует пролиферации и сохранению жизнеспособности ранних предшественников лимфоцитов и эпителиальных клеток тимуса.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведённые исследования показали эффективность применения пористого гидрофильно-гидрофобного сорбента на основе оксида алюминия и полидиметилсилоксана Al₂O₃@ПДМС в условиях длительного воздействия стресса, обусловленного круглосуточным освещением в течение 14 суток. Применение сорбента позволило сохранить функции тимуса, поддерживая жизнеспособность и пролиферацию молодых лимфоцитов и эпителиальных клеток этого органа. Полученные данные свидетельствуют о целесообразности профилактической сорбционной терапии на фоне нарушения суточных ритмов при смене часовых поясов у лиц, работаю-

щих в ночное время, или у жителей северных регионов со значительными колебаниями освещённости в течение года, помогающей поддерживать собственные защитные силы организма, нормализуя клеточный иммунитет.

Конфликт интересов

Авторы данной статьи заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование

Исследование поддержано бюджетным проектом НИИКЭЛ – филиала ИЦиГ СО РАН (FWNR-2022-0009). В работе использовано оборудование Центра генетических ресурсов лабораторных животных (ИЦиГ СО РАН) и оборудования ЦКП ФИЦ ФТМ «Протеомный анализ», поддержанного финансированием Минобрнауки России (соглашение № 075-15-2021-691).

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Koronowski KB, Sassone-Corsi P. Communicating clocks shape circadian homeostasis. *Science*. 2021; 37(6530): eabd0951. doi: 10.1126/science.abd0951
2. Arendt J. Melatonin: Countering chaotic time cues. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2019; 10: 391. doi: 10.3389/fendo.2019.00391
3. Brown LA, Fisk AS, Potheary CA, Peirson SN. Telling the time with a broken clock: Quantifying circadian disruption in animal models. *Biology (Basel)*. 2019; 8(1): 18. doi: 10.3390/biology8010018
4. Taves MD, Ashwell JD. Glucocorticoids in T cell development, differentiation and function. *Nat Rev Immunol*. 2021; 21(4): 233-243. doi: 10.1038/s41577-020-00464-0
5. Cowan JE, Takahama Y, Bhandoola A, Ohigashi I. Postnatal involution and counter-involution of the thymus. *Front Immunol*. 2020; 11: 897. doi: 10.3389/fimmu.2020.00897
6. Kinsella S, Dudakov JA. When the damage is done: Injury and repair in thymus function. *Front Immunol*. 2020; 11: 1745. doi: 10.3389/fimmu.2020.01745
7. Miller JFAP. The discovery of thymus function and of thymus-derived lymphocytes. *Immunol Rev*. 2002; 185: 7-14. doi: 10.1034/j.1600-065x.2002.18502.x
8. Dai X, Zhang D, Wang C, Wu Z, Liang C. The pivotal role of thymus in atherosclerosis mediated by immune and inflammatory response. *Int J Med Sci*. 2018; 15(13): 1555-1563. doi: 10.7150/ijms.27238
9. Бородин Ю.И., Коненков В.И., Пармон В.Н., Любарский М.С., Рачковская Л.Н., Бгатова Н.П., и др. Биологические свойства сорбентов и перспективы их применения. *Успехи современной биологии*. 2014; 134(3): 236-248. [Borodin Yul, Konenkov VI, Parmon VN, Lyubarsky MS, Rachkovskaya LN, Bgatova NP, et al. Biological properties of sorbents and their application in practice. *Uspekhi sovremennoy biologii*. 2014; 134(3): 236-248. (In Russ.)]
10. Королев М.А., Рачковская Л.Н., Мадонов П.Г., Шурлыгина А.В., Рачковский Э.Э., Летягин А.Ю., и др. Оценка острой токсичности лекарственного средства на основе комплекса лития цитрата, полиметилсилоксана, оксида алюминия. *Сибирский научный медицинский журнал*. 2020; 40(5): 46-52. [Korolev MA, Rachkovskaya LN, Madonov PG, Shurlygina AV, Rachkovsky EE,

Letyagin AYu, et al. Estimation of acute toxicity of a drug based on the complex of lithium citrate, polymethylsiloxane, aluminum oxide. *Siberian Scientific Medical Journal*. 2020; 40(5): 46-52. (In Russ.)). doi: 10.15372/SSMJ20200505

11. Шурлыгина А.В., Мичурина С.В., Рачковская Л.Н., Серых А.Е., Мирошниченко С.М., Рачковский Э.Э., и др. Влияние комплекса мелатонина, оксида алюминия и полиметилсилоксана на клеточный состав селезенки мышей, содержащихся в условиях круглосуточного освещения. *Acta biomedica scientifica*. 2021; 6(4): 252-264. [Shurlygina AV, Michurina SV, Rachkovskaya LN, Serykh AE, Miroshnichenko SM, Rachkovsky EE, et al. The effect of a complex of melatonin, aluminum oxide and polymethylsiloxane on the cellular composition of the mice spleen kept in round-the-clock lighting conditions. *Acta biomedica scientifica*. 2021; 6(4): 252-264. (In Russ.)). doi: 10.29413/ABS.2021-6.4.23

12. Michurina SV, Miroshnichenko SM, Serykh AE, Ishchenko IYu, Letyagin AYu, Zavjalov EL. Light-induced functional pinealectomy. Effect on the thymus of C57BL/6 mice. *Bull Exp Biol Med*. 2022; 174(1): 152-158. doi: 10.1007/s10517-022-05665-2

13. Pinheiro RGR, Alves NL. The early postnatal life: A dynamic period in thymic epithelial cell differentiation. *Front Immunol*. 2021; 12: 668528. doi: 10.3389/fimmu.2021.668528

14. Qiao S, Li X, Zilioli S, Chen Z, Deng H, Pan J, et al. Hair measurements of cortisol, DHEA, and DHEA to cortisol ratio as biomarkers of chronic stress among people living with HIV in China: Known-group validation. *PLoS One*. 2017; 12(1): e0169827. doi: 10.1371/journal.pone.0169827

15. Бгатова Н.П., Рачковская Л.Н. Влияние длительного введения в рацион животных углеродминерального сорбента СУМС-1 на ультраструктурную организацию кишечной ворсинки. *Проблемы саногенного и патогенного эффектов экологических воздействий на внутреннюю среду организма: Материалы 2-го международного симпозиума (Чолпон-Ата, 1995)*. 1995: 14-15. [Bgatova NP, Rachkovskaya LN. The effect of long-term introduction of the carbon-mineral sorbent SUMS-1 into the diet of animals on the ultrastructural organization of the intestinal villi. *Problems of sanogenic and pathogenic effects of ecological impact on the internal environment of the body: Proceedings of the 2nd International Symposium (Cholpon-Ata, 1995)*. 1995: 14-15. (In Russ.)).

16. Huo R, Zeng B, Zeng L, Cheng K, Li B, Luo Y, et al. Microbiota modulate anxiety-like behavior and endocrine abnormalities in hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Front Cell Infect Microbiol*. 2017; 7: 489. doi: 10.3389/fcimb.2017.00489

17. Moya-Pérez A, Perez-Villalba A, Benítez-Páez A, Campillo I, Sanz Y. Bifidobacterium CECT 7765 modulates early stress-induced immune, neuroendocrine and behavioral alterations in mice. *Brain Behav Immun*. 2017; 65: 43-56. doi: 10.1016/j.bbi.2017.05.01

18. Cohen Kadosh K, Basso M, Knytl P, Johnstone N, Lau JYF, Gibson GR. Psychobiotic interventions for anxiety in young people: A systematic review and meta-analysis, with youth consultation. *Transl Psychiatry*. 2021; 11(1): 352. doi: 10.1038/s41398-021-01422-7

19. Wong ML, Inserra A, Lewis MD, Mastronardi CA, Leong L, Choo J, et al. Inflammasome signaling affects anxiety- and depressive-like behavior and gut microbiome composition. *Mol Psychiatry*. 2016; 21(6): 797-805. doi: 10.1038/mp.2016.46

Сведения об авторах

Мирошниченко Светлана Михайловна – научный сотрудник лаборатории фармацевтических технологий, Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии – филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН»; научный сотрудник лаборатории молекулярных механизмов межклеточных взаимодействий, Научно-исследовательский институт биохимии – филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины», e-mail: svmiro@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-6740-8241>

Мичурина Светлана Викторовна – доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник, заведующая группой экспериментальной фармакологии, Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии – филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН», e-mail: michurinasv3000@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-3630-4669>

Ищенко Ирина Юрьевна – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник группы экспериментальной фармакологии, Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии – филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН», e-mail: irenisch@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-6281-0402>

Рачковская Любовь Никифоровна – кандидат химических наук, заведующая лабораторией фармацевтических технологий, Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии – филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН», e-mail: noolit@niikel.ru, <https://orcid.org/0000-0001-9622-5391>

Серых Анастасия Евгеньевна – младший научный сотрудник группы экспериментальной фармакологии, Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии – филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН»; младший научный сотрудник лаборатории молекулярных механизмов свободнорадикальных процессов, Научно-исследовательский институт экспериментальной и клинической медицины – филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины», e-mail: rasiel1996@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-5817-6055>

Рачковский Эдмунд Эдмундович – кандидат химических наук, старший научный сотрудник лаборатории фармацевтических технологий, Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии – филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН», e-mail: reed@academ.org, <https://orcid.org/0000-0003-3756-4873>

Летягин Андрей Юрьевич – профессор, доктор медицинских наук, заместитель руководителя филиала по научной и клинической работе, Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии – филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН», e-mail: letyagin-andrey@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-9293-4083>

Information about the authors

Svetlana M. Miroshnichenko – Research Officer at the Laboratory of Pharmaceutical Technology, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology – Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences; Research Officer at the Laboratory of Molecular Mechanisms of Intercellular Interactions, Institute of Biochemistry, Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine, e-mail: svmiro@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-6740-8241>

Svetlana V. Michurina – Dr. Sc. (Med.), Professor, Leading Research Officer, Head of the Group of Experimental Pharmacology, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology – Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, e-mail: michurinasv3000@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-3630-4669>

Irina Yu. Ishchenko – Cand. Sc. (Biol.), Leading Research Officer at the Group of Experimental Pharmacology, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology – Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, e-mail: irenisch@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-6281-0402>

Lubov N. Rachkovskaya – Cand. Sc. (Chem.), Head of the Laboratory of Pharmaceutical Technology, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology – Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, e-mail: noolit@niikel.ru, <https://orcid.org/0000-0001-9622-5391>

Anastasiya E. Serykh – Junior Research Officer at the Group of Experimental Pharmacology, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology – Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences; Junior Research Officer at the Laboratory of Molecular Mechanisms of Free Radical Processes, Research Institute of Experimental and Clinical Medicine, Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine, e-mail: rasiel1996@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-5817-6055>

Edmund E. Rachkovsky – Cand. Sc. (Chem.), Senior Research Officer at the Laboratory of Pharmaceutical Technology, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology – Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, e-mail: reed@academ.org, <https://orcid.org/0000-0003-3756-4873>

Andrey Yu. Letyagin – Dr. Sc. (Med.), Professor, Deputy Head of the Branch for Scientific and Medical Work, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology – Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, e-mail: letyagin-andrey@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-9293-4083>