

УДК 611.018.84

Шмаков М. А., Лошков К. Е., Ефремов Е. Ю., Захарова К. Ю., Лузикова Е. М.

ВЛИЯНИЕ МЕЛАТОНИНА НА S-100-ПОЗИТИВНЫЕ И GFAP-ПОЗИТИВНЫЕ КЛЕТКИ МОЗЖЕЧКА В РАЗНЫХ СВЕТОВЫХ УСЛОВИЯХ

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

Аннотация. Метаболические окислительные нарушения часто вызывают быстрые изменения в глиальных клетках. Ключевыми показателями этого ответа являются повышенный синтез GFAP и S-100.

Целью работы является изучение реактивности глии в мозжечке в условиях постоянного освещения и постоянного затемнения, а также оценка влияния мелатонина на астроглию.

Методика работы. Объектом исследования был ствол головного мозга аутибренных лабораторных мышей-самцов линии Wistar (n = 60) массой 16–18 г, вступивших в экспериментальную процедуру в возрасте 8–9 недель. Животные были разделены на 6 групп: группа контроля (I), группа, находившаяся в естественных световых условия и получавшая перорально с питьевой водой мелатонин в виде препарата «Меларитм» (мелатонин, АО «ФП «Оболenskое») в концентрации 6,5 мг/л (II); группа, находившаяся в условиях отсутствия фотопериода (клетки находились в темной комнате) (III); группа, находившаяся в условиях постоянного затемнения и получавшая перорально с питьевой водой мелатонин (IV); группа, находившаяся в условиях постоянного освещения (V); группа, находившаяся в условиях постоянного освещения и получавшая перорально с питьевой водой мелатонин (VI).

Основные результаты работы показали, что снижение количества активированных астроцитов (GFAP-позитивных) во всех экспериментальных группах сопровождается снижением экспрессии GFAP, что является показателем подавления активности астроцитов. Заметим, что наиболее выраженные изменения происходят в группах, где мелатонин вводился на фоне постоянного затемнения или освещения. Также при введении мелатонина наблюдается рост числа и экспрессии S-100-позитивных клеток, кроме группы, где мелатонин вводился в условиях постоянного освещения (там произошло снижение числа таких клеток). Снижение синтеза GFAP с одновременным увеличением синтеза S-100 позволяет предположить, что увеличение S-100 происходит не за счет активации астроцитов, а за счет повышения трофики нейронов.

Ключевые слова: мозжечок, астроциты, мелатонин, фотопериод, нейропротекция.

Shmakov M. A., Loshkov K. E., Efremov E. Yu., Zakharova K. Yu., Luzikova E. M.

EFFECT OF MELATONIN ON S-100-POSITIVE AND GFAP-POSITIVE CEREBELLAR CELLS IN DIFFERENT LIGHT CONDITIONS

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

Abstract. Metabolic oxidative disorders often cause rapid changes in glial cells. The key indicators of this response are increased synthesis of GFAP and S-100.

The aim of the work is to study the reactivity of glia in the cerebellum under conditions of constant illumination and constant dimming, as well as to assess the effect of melatonin on astroglia.

Materials and methods. The object of our work was the brain stem of outbred male laboratory mice of the Wistar line ($n = 60$) weighing 16–18 g. Who entered the experimental procedure at the age of 8–9 weeks. The animals were divided into 6 groups: the control group (I), the group that was in natural light conditions and received melatonin orally with drinking water in the form of the drug «Melaritm» («Obolenskoye») at a concentration of 4 mg / liter (II); the group that was in the absence of a photoperiod (cells were in a dark room) (III); a group that was in constant darkening and received melatonin orally with drinking water (IV); a group that was in constant lighting (V); a group that was under constant lighting conditions and received melatonin (VI) orally with drinking water.

The main results of the work showed that a decrease in the number of activated astrocytes (GFAP-positive) in all experimental groups is accompanied by a decrease in the expression of GFAP, which is an indicator of the suppression of astrocyte activity. Note that the most pronounced changes occur in groups where melatonin was administered against a background of constant dimming or illumination. Also, with the introduction of melatonin, there is an increase in the number and expression of S-100-positive cells, except for the group where melatonin was administered under constant lighting conditions (there was a decrease in the number of such cells). A decrease in the synthesis of GFAP with a simultaneous increase in the synthesis of S-100 suggests that the increase in S-100 is not due to the activation of astrocytes, but due to an increase in the trophic neurons.

Keywords: cerebellum, astrocytes, melatonin, photoperiod, neuroprotection.

ВВЕДЕНИЕ

Сон контролируется двумя процессами — циркадными колебаниями и гомеостазом сна. Установлено, что гомеостатический механизм сна регулируется накоплением аденозина. Астроциты являются источником пресинаптического торможения через рецепторы аденозина 1 (A1R). Астроциты модулируют гомеостаз сна, регулируя медленные колебания [1]. В свою очередь, эндогенный мелатонин является ключевым регулятором циркадных ритмов и мощным антиоксидантом [2]. Мелатонин играет важную роль в нейральных клетках ствола мозга, включая их пролиферацию, дифференцировку и выживание [3, 4]. Астроциты, как и клетки других экстрапинальных структур (кожа, хрусталик, желудочно-кишечный тракт, яички, яичники, лимфоциты), также могут производить ме-

латонин [5]. Астроциты задействованы в большом спектре патологических процессов головного и спинного мозга. Эти клетки в зависимости от особенностей повреждающего фактора и соответствующих ему специфических сигнальных систем и молекулярных эффекторных механизмов оказывают как благоприятное, так и негативное воздействие на исход патологического процесса. Реактивные астроциты обладают рядом молекулярных механизмов, направленных на защиту клеток мозга в условиях повреждения, включая захват потенциально токсичного избыточного глутамата, защиту от окислительного стресса за счет продукции глутатиона; секрецию нейропротекторных факторов; восстановление гематоэнцефалического барьера, подавление вазогенного отека и другие [6]. При этом в ответ на патологию они способны, изменяя свои морфофункциональные свойства, оказывать и отрицательное влияние на течение патологических процессов [6, 7].

Мелатонин играет важную роль в уменьшении воспаления [2, 8]. Он ингибирует образование рубцов реактивными астроцитами, воздействуя на воспалительные цитокины после травмы спинного мозга [8–10]; подавляет экспрессию провоспалительных маркеров iNOS (синтаза оксида азота), IL-1 β (интерлейкин-1 β) и TNF- α (фактор некроза опухоли- α); значительно подавляет экспрессию каспазы-3, Вах и GFAP, а также повышает экспрессию Bcl-2 в клетках поврежденного травмой спинного мозга [10]. Кроме того, мелатонин значительно уменьшает вызванную оксалиплатином экспрессию GFAP и ингибирует синтез этих же воспалительных медиаторов (IL-1 β , TNF- α), а также хемокинов, включая хемоаттрактантный белок-1 моноцитов (MCP-1) и воспалительный белок моноцитов-1 (MIP-1 α) в зависимости от дозы (10 и 100 мкМ) [11]. Установлено, что мелатонин снижает проницаемость ГЭБ через ингибирование MMP-9 (матриксной металлопротеиназы-9) [12]. Исследование астроцитов в модели нейропатии вследствие демиелинизации срединного нерва показало, что гипертрофия астроцитов, но не их пролиферация, способствовала увеличению экспрессии GFAP, а мелатонин ее снижал [13].

Способность мелатонина предотвращать повреждение тканей, а также его участие в удалении свободных радикалов [14] обеспечивает его способность восстанавливать структуры мозга после гипоксической ишемии инсульта [15]. При этом экспрессия GFAP повышается через 24 часа [16].

Многочисленные модели исследований действия мелатонина на нервную ткань выявили его дуалистичность; мелатонин оказывает нейропротективный эффект за счет восстановления рецепторов MT1, ингибирования путей гибели митохондриальных клеток и подавления активации астроцитов и микроглии [17, 18], модуляции аутофагии [19] и в то же время активирует астроциты посредством сигнального пути PKC α / Nrf2 / HO-1, чтобы противостоять окислительному стрессу и апоптозу после внутримозгового кровоизлияния [14]. Астроциты могут защищать эндотелиальные клетки через повышение экспрессии белка AroE в экспериментальной модели инсульта, а мелатонин может дополнительно индуцировать экспрессию AroE для защиты эндотелиальных клеток [20]. Мелатонин способен подавлять пролиферацию микроглии и астроцитов в гиппокампе [5, 21] и регулировать экспрессию маркеров микроглии (интегрин- α M) и астроцитов (GFAP) [21]. Мелатонин уменьшает нейротоксичность и активацию астроцитов, индуцированную растворимым олигомером A β 1-42 в коре головного мозга,

во время развития болезни Альцгеймера [21–23] посредством регуляции передачи сигналов Reelin-Dab1 при болезни Альцгеймера [23].

Однако в литературе данных о влиянии фотопериода на эффекты мелатонина нами обнаружены не были. Мы предполагаем, что одним из факторов, объясняющих разнонаправленное действие мелатонина на клетки нервной ткани, может быть световой режим, в котором находится организм.

Цель работы — изучить влияние фотопериода на реализацию эффектов экзогенного мелатонина в нервной ткани ствола мозга.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования был ствол головного мозга аутибредных лабораторных крыс-самцов линии Wistar ($n = 60$) массой 180–200 г., вступивших в экспериментальную процедуру в возрасте 8–9 недель. Животные содержались в стандартных условиях вивария в течение 4 недель и были разделены на 6 групп: группа контроля (I), группа, находившаяся в естественных световых условиях и получавшая перорально с питьевой водой мелатонин в виде препарата «Меларитм» (мелатонин, АО «ФП «Оболенское») в концентрации 6,5 мг/литр (II); группа, находившаяся в условиях отсутствия фотопериода (клетки находились в темной комнате) (III); группа, находившаяся в условиях постоянного затемнения и получавшая перорально с питьевой водой мелатонин (IV); группа, находившаяся в условиях постоянного освещения (V); группа, находившаяся в условиях постоянного освещения и получавшая перорально с питьевой водой мелатонин (VI).

Идентификацию астроцитов проводили с помощью непрямого иммуногистохимического метода с использованием поликлональных антител к глиальному фибриллярному кислом белку (GFAP) и белку S-100. Подсчет клеток был произведен с использованием микроскопа «Carl Zeiss Axio Scope A1» при увеличении 400 и программы «SigmaScan Pro 5». Статистическая обработка производилась с использованием программ «MS Excel» и «Statistica 17».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно нашим результатам, снижение количества активированных астроцитов (GFAP-позитивных) во всех экспериментальных группах сопровождается снижением экспрессии GFAP, что является показателем подавления активности астроцитов. Наиболее выраженные изменения происходят в группах, где мелатонин вводился на фоне постоянного затемнения или освещения. Также при введении мелатонина наблюдается рост числа и экспрессии S-100-позитивных клеток, кроме группы, где мелатонин вводился в условиях постоянного освещения (там выявлено снижение числа таких клеток). Снижение синтеза GFAP с одновременным увеличением синтеза S-100 позволяет предположить, что увеличение S-100 происходит не за счет активации астроцитов, а за счет повышения трофики нейронов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нейропротекторное действие мелатонина на ткань мозжечка зависит от фотопериода. По нашему мнению, мелатонин необходимо применять для коррекции астроглиопатологий (реактивного астроглиоза, астродегенераций, патологического ремоделирования астроцитов), возникающих при неврологических, нерв-

но-психических, метаболических и психических расстройствах, а также при инфекциях и токсических инсультах с учетом фотопериода организма. Эти данные имеют значение для пациентов неврологических отделений, лиц с черепно-мозговыми и спинномозговыми травмами, а также лиц с различными острыми нарушениями мозгового кровообращения (ОНМК) в восстановительном периоде.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Haydon P. G.* Astrocytes and the modulation of sleep. *Curr Opin Neurobiol.* 2017; 44:28–33. DOI: 10.1016/j.conb.2017.02.008
2. *Morris G., Stubbs B., Köhler C.A., Walder K., Slyepchenko A., Berk M., et al.* The putative role of oxidative stress and inflammation in the pathophysiology of sleep dysfunction across neuropsychiatric disorders: Focus on chronic fatigue syndrome, bipolar disorder and multiple sclerosis. *Sleep Med Rev.* 2018; 41:255–265. DOI: 10.1016/j.smr.2018.03.007
3. *Chu J., Tu Y., Chen J., Tan D., Liu X., Pi R.* Effects of melatonin and its analogues on neural stem cells. *Mol Cell Endocrinol.* 2016; 420:169–179. DOI: 10.1016/j.mce.2015.10.012
4. *Li Z., Li X., Chan M.T.V., Wu W. K. K., Tan D., Shen J.* Melatonin antagonizes interleukin-18-mediated inhibition on neural stem cell proliferation and differentiation. *J Cell Mol Med.* 2017; 21(9):2163–2171. DOI: 10.1111/jcmm.13140
5. *Samanta S.* Melatonin: an endogenous miraculous indolamine, fights against cancer progression. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2020; 146(8):1893–1922. DOI: 10.1007/s00432-020-03292-w
6. *Уранова Н. А., Вухрева О. В., Рахманова В. И., Орловская Д. Д.* Реактивность перинеурональных астроцитов в префронтальной коре при шизофрении (ультраструктурно-морфометрическое исследование) // Журнал неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова. 2014. Т. 114. № 12. С. 65–72. DOI: 10.17116/jnevro201411412165-72
7. *Uranova N. A., Vukhreva O. V., Rakhmanova V. I., Orlovskaja D. D.* Reactivity of perineuronal astrocytes in the prefrontal cortex in schizophrenia: an ultrastructural morphometric study. *Zh Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova.* 2014; 114(12):65–72. (In Russ.). DOI: 10.17116/jnevro201411412165-72
8. *Verkhatsky A., Ho M. S., Vardjan N., Zorec R., Parpura V.* General Pathophysiology of Astroglia. *Adv Exp Med Biol.* 2019; 1175:149–179. DOI: 10.1007/978-981-13-9913-8_7
9. *Krityakiarana W., Sompup K., Jongkamonwivat N., Mukda S., Pinilla F.G., Govitrapong P., et al.* Effects of melatonin on severe crush spinal cord injury-induced reactive astrocyte and scar formation. *J Neurosci Res.* 2016; 94(12):1451–1459. DOI: 10.1002/jnr.23930
10. *Liu X., Wang Y., Yang J., Liu Y., Zhou D., Hou M. et al.* Anti-edema effect of melatonin on spinal cord injury in rats. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2015; 159(2):220–226. DOI: 10.5507/bp.2015.012
11. *Yang Z., Bao Y., Chen W., He Y.* Melatonin exerts neuroprotective effects by attenuating astro- and microgliosis and suppressing inflammatory response following spinal cord injury. *Neuropeptides.* 2020; 79:102002. DOI: 10.1016/j.npep.2019.102002

12. Wang Y. S., Li Y. Y., Cui W., Li L. B., Zhang Z. C., Tian B. P., et al. Melatonin Attenuates Pain Hypersensitivity and Decreases Astrocyte-Mediated Spinal Neuroinflammation in a Rat Model of Oxaliplatin-Induced Pain. *Inflammation*. 2017; 40(6):2052–2061. DOI: 10.1007/s10753-017-0645-y
13. Qin W., Li J., Zhu R., Gao S., Fan J., Xia M., et al. Melatonin protects blood-brain barrier integrity and permeability by inhibiting matrix metalloproteinase-9 via the NOTCH3/NF- κ B pathway. *Aging (Albany NY)*. 2019; 11(23):11391–11415. DOI: 10.18632/aging.102537
14. Huang C. T., Chen S. H., Chang C. F., Lin S. C., Lue J. H., Tsai Y. J. Melatonin reduces neuropathic pain behavior and glial activation through MT2 melatonin receptor modulation in a rat model of lysophosphatidylcholine-induced demyelination neuropathy. *Neurochem Int*. 2020; 140:104827. DOI: 10.1016/j.neuint.2020.104827
15. Chen X., Xi Z., Liang H., Sun Y., Zhong Z., Wang B., et al. Melatonin Prevents Mice Cortical Astrocytes From Hemin-Induced Toxicity Through Activating PKC α /Nrf2/HO-1 Signaling in vitro. *Front Neurosci*. 2019; 13:760. DOI: 10.3389/fnins.2019.00760
16. Revuelta M., Arteaga O., Montalvo H., Alvarez A., Hilario E., Martinez-Ibargüen A. Antioxidant Treatments Recover the Alteration of Auditory-Evoked Potentials and Reduce Morphological Damage in the Inferior Colliculus after Perinatal Asphyxia in Rat. *Brain Pathol*. 2016; 26(2):186–98. DOI: 10.1111/bpa.12272
17. Revuelta M., Arteaga O., Alvarez A., Martinez-Ibargüen A., Hilario E. Characterization of Gene Expression in the Rat Brainstem After Neonatal Hypoxic-Ischemic Injury and Antioxidant Treatment. *Mol Neurobiol*. 2017; 54(2):1129–1143. DOI: 10.1007/s12035-016-9724-6
18. Sinha B., Wu Q., Li W., Tu Y., Sirianni A. C., Chen Y., et al. Protection of melatonin in experimental models of newborn hypoxic-ischemic brain injury through MT1 receptor. *J Pineal Res*. 2018; 64(1). DOI: 10.1111/jpi.12443
19. Jou M. J., Peng T. I., Reiter R. J. Protective stabilization of mitochondrial permeability transition and mitochondrial oxidation during mitochondrial Ca²⁺ stress by melatonin's cascade metabolites C3-OHM and AFMK in RBA1 astrocytes. *J Pineal Res*. 2019; 66(1):e12538. DOI: 10.1111/jpi.12538
20. Morris G., Stubbs B., Köhler C. A., Walder K., Slyepchenko A., Berk M. et al. The putative role of oxidative stress and inflammation in the pathophysiology of sleep dysfunction across neuropsychiatric disorders: Focus on chronic fatigue syndrome, bipolar disorder and multiple sclerosis. *Sleep Med Rev*. 2018; 41:255–265. DOI: 10.1016/j.smrv.2018.03.007.
21. Xiang J., Zhu W., Yang F., Yu Z. H., Cai M., Li X. T., et al. Melatonin-induced ApoE expression in mouse astrocytes protects endothelial cells from OGD-R induced injuries. *Transl Psychiatry*. 2020; 10(1):181. DOI: 10.1038/s41398-020-00864-9. Erratum in: *Transl Psychiatry*. 2020; 10(1):240
22. Lwin T., Yang J. L., Ngampramuan S., Viwatpinyo K., Chancharoen P., Veschsanit N. et al. Melatonin ameliorates methamphetamine-induced cognitive impairments by inhibiting neuroinflammation via suppression of the TLR4/MyD88/NF κ B signaling pathway in the mouse hippocampus. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2020; 15:110109. DOI: 10.1016/j.pnpbp.2020.110109
23. Mueed Z., Rai P. K., Kamal M. A., Poddar N. K. Decoding the Inter-relationship between Sleep Disorders and Alzheimer's disease Pathogenesis. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2021; 20(8):723–735. DOI: 10.2174/1871527319666200903161249

24. *Hu C., Wang P., Zhang S., Ren L., Lv Y., Yin R., Bi J.* Neuroprotective effect of melatonin on soluble A β 1-42-induced cortical neurodegeneration via Reelin-Dab1 signaling pathway. *Neuro Res.* 2017; 39(7):621–631. DOI: 10.1080/01616412.2017.1312805
25. *Коржевский Д. Э., Григорьев И. П., Гусельникова В. В., Колос Е.А., Петрова Е. С., Кирик О. В.* и др. Иммуногистохимические маркеры для нейробиологии // Медицинский академический журнал. 2019. Т. 19. № 4. С. 7–24. DOI: <https://doi.org/10.17816/MAJ16548>
26. *Korzhevskii D. E., Grigor'ev I. P., Gusel'nikova V. V., Kolos E. A., Petrova E. S., Kirik O. V.* et al. Immunohistochemical markers for neurobiology // *Medical Academic Journal.* 2019; 19(4):7–24. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.17816/MAJ16548>
27. *González L. L., Garrie K., Turner M. D.* Role of S100 proteins in health and disease. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2020; 1867(6):118677. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2020.118677

УДК 616-001.45-001.5

Шперлинг И. А., Шулепов А. В., Ростовцев С. О., Баженов М. В., Семакин Р. В.

САНОГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ РАННЕЙ КОРРЕКЦИИ ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТОЙ МЕСТНЫХ ПОВРЕЖДЕНИЙ МЯГКИХ ТКАНЕЙ ПРИ ВЗРЫВНОЙ ТРАВМЕ (ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины Министерства обороны РФ, Санкт-Петербург, Российская Федерация

Аннотация. Цель работы: изучение эффективности раннего перифокального применения геля гиалуроновой кислоты (ГК) при лечении взрывной травмы мягких тканей в эксперименте (ВТ).

Методика работы включала анализ степени выраженности отека поврежденной конечности, проявлений посттравматического рабдомиолиза и гистоморфологических изменений в поврежденной мышце в условиях раннего местного применения ГК.

Контингент испытуемых был представлен 3 группами: основная, сравнения и интактная. Общее количество: 58 крыс-самцов линии Вистар, возраст 3,5–4 месяца. Интактная группа без повреждений, у остальных моделировалась ВТ в соответствии с ранее предложенной методикой.

Основные результаты эксперимента показали, что раннее локальное применение ГК при ВТ мягких тканей снижает выраженность микроциркуляторных нарушений в области повреждения, уменьшает долю некротизированных мышечных волокон, стимулирует неомиогенез с увеличением доли мышечной ткани в формируемом соединительнотканном регенерате.

Ключевые слова: взрывная травма, рабдомиолиз, гиалуроновая кислота, регенерация, микроциркуляция, гистоморфология.