

І.Ф. Лабунець

Вікові зміни мелатонінутворювальної функції епіфіза у імунізованих Т-залежним антигеном мишей лінії СВА

У взрослых и старых мышей линии СВА исследована концентрация в крови мелатонина в разные сроки после инъекции 3%-й суспензии эритроцитов барана (ЭБ), а также влияние модуляции функции эпифиза на взаимосвязь изменений эндокринной функции тимуса и глюкокортикоидной функции коры надпочечников у старых иммунизированных мышей. Установлено, что у взрослых мышей после инъекции ЭБ концентрация мелатонина существенно увеличилась через 20 мин, снизилась через 3 ч и соответствовала значениям интактных животных через 4 сут. У старых иммунизированных мышей концентрация мелатонина постепенно снижалась. В то же время после введения ЭБ старым мышам, у которых мелатонинобразующая функция эпифиза была усилена с помощью пептидного фактора эпифиза эпиталамина, временная динамика изменений уровня тимического гормона и кортикостерона приближалась к показателям взрослых иммунизированных мышей.

ВСТУП

При старінні імунна відповідь на чужорідні антигени значно зменшується [6, 7]. Це може бути пов'язане зі зміною кількості Т-лімфоцитів і балансу їх регуляторних субпопуляцій, особливостями клітинної кооперації та продукції деяких цитокінів тощо [6]. На мишах лінії СВА нами було встановлено, що в механізмі вікових змін імунної відповіді має також значення порушення функцій і взаємодії тимуса і кори надниркових залоз [10]. Глюкокортикоїди забезпечують адекватну за інтенсивністю імунну реакцію, а тимічні гормони можуть бути зв'язувальною ланкою між імунною та нейроендокринною системами [9, 19, 23].

Показано, що зміни функціонального стану імунної та ендокринної систем під впливом антигенів різної природи, зокрема Т-залежних, подібні до стресових [9, 10, 19]. Епіфіз відіграє велику роль в адаптивних реакціях гіпоталамо-гіпофізарно-наднир-

кової системи при дії різних стресових чинників і позитивно впливає на ендокринну функцію тимуса [3, 5, 12]. Причому дані літератури свідчать про те, що мелатонінутворювальна функція епіфіза підпорядкована фазовим коливанням при розвитку стресових реакцій організму. Так, встановлено, що у щурів в умовах гіпотермії активація функції залози в ранні строки її дії змінюється поступовим гальмуванням і навіть різким зменшенням концентрації мелатоніну в епіфізі [5]. Водночас з віком у тварин мелатонінутворювальна функція епіфіза слабшає, а імунізація старих мишей лінії СВА, у яких функція епіфіза була посилена, викликає істотне збільшення вмісту антитіл у крові [1, 7, 11, 22]. Проте характер антигеніндукованих змін функції епіфіза при старінні та можливі ендокринні механізми впливу залози на імунні реакції залишаються недостатньо вивченими.

Мета нашої роботи – дослідити вікові особливості мелатонінутворювальної функ-

ції епіфіза після введення тимусзалежного антигена; оцінити вплив модуляції функції епіфіза на вміст тимічних гормонів і глюкокортикоїдів у старих імунізованих мишей.

МЕТОДИКА

Експеримент було проведено на дорослих (4–5 міс) і старих (23–24 міс) самицях мишей лінії СВА (розплідник Інституту геронтології АМН України).

Для дослідження вікових особливостей антигеніндукованих змін мелатонінутворювальної функції епіфіза дорослих ($n=19$) і старих ($n=16$) мишей вранці (8.30–9.00) внутрішньоочередивно імунізували тимусзалежним антигеном – 3%-ю суспензією еритроцитів барана (ЕБ) в об'ємі $1,0 \cdot 10^{-3}$ на 100 г маси [9, 10]. Контрольні дорослі ($n=18$) і старі ($n=14$) миші отримали одну ін'єкцію 0,9%-го розчину хлориду натрію у тому ж об'ємі. Через 20 хв, 3 год і 4 доби після ін'єкції ЕБ і в ті самі строки після введення фізіологічного розчину дорослих і старих мишей декапітували під ефірним наркозом. Вибрані строки досліджень відповідали певним етапам розвитку імуноної відповіді [9, 19].

Вплив модуляції функції епіфіза на антигеніндуковані зміни функціонального стану тимуса та кори надниркових залоз досліджували на старих мишах. Останнім з метою активації мелатонінутворювальної функції епіфіза вводили його пептидний препарат епіталамін, який істотно підвищує вміст мелатоніну як у самому епіфізі, так і у крові тварин різного віку [4, 11, 16]. Разова доза епіталаміну становила 0,5 мг на 100 г маси. Препарат вводили старим мишам вранці підшкірно одним курсом, який включав 5 ін'єкцій з інтервалом 2–3 доби ($n=21$). Контрольні старі миші отримали відповідну кількість ін'єкцій 0,9%-го розчину хлориду натрію ($n=24$). Через 3 доби після останньої ін'єкції старих мишей внутрішньоочередивно імунізували 3%-ю

суспензією ЕБ. Через 15 хв, 1 і 4 доби після введення ЕБ усіх старих мишей декапітували під ефірним наркозом у ранкові часи доби.

Крім того, в роботі були використані інтактні дорослі ($n=14$) і старі ($n=12$) миші лінії СВА.

Отриману сироватку зберігали при -20°C упродовж 1 міс.

Концентрацію мелатоніну у крові мишей визначали радіоімунним методом за допомогою kit “Melatonine Plasma RIA” фірми “Biosource” (Бельгія).

Ендокринну функцію тимуса оцінювали за вмістом у крові тимічного сироваткового фактора (ТСФ) [18]. Концентрацію кортикостерону у сироватці крові визначали із використанням кортикостероїдзв'язувального глобуліну, який був виділений із сироватки крові самиць мишей [20].

Цифрові результати обробляли статистично за допомогою критерію *t* Стьюдента [13]. Наявність зв'язку між показниками оцінювали за допомогою коефіцієнта кореляційного відношення “ η ”.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У першій серії експериментів ми досліджували вплив Т-залежного антигена на мелатонінутворювальну функцію епіфіза у мишей лінії СВА різного віку. Встановлено, що у інтактних дорослих і старих мишей вміст мелатоніну у сироватці крові становить $69,4 \pm 15,9$ ($n=14$) і $93,3$ пмоль/л $\pm 14,2$ пмоль/л ($n=12$) відповідно (табл. 1). Через 20 хв після ін'єкції ЕБ концентрація мелатоніну в крові дорослих мишей перевищувала показник не тільки у інтактних мишей ($P < 0,05$), але й у контрольних дорослих тварин. Так, якщо у останніх значення показника більше ніж 200 пмоль/л було у 50 % мишей (у 3 із 6 тварин), то після ін'єкції ЕБ – у 100 % мишей ($P < 0,05$; $n=8$). У дорослих мишей через 3 год після введення ЕБ концентрація мелатоніну у сироватці крові істотно зменшилася порівняно з більш раннім строком, а також інтактними

Таблиця 1. Вміст мелатоніну (пмоль/л) у крові дорослих і старих мишей лінії СВА в різні строки після однієї ін'єкції фізіологічного розчину (контроль) і 3 %-ї суспензії еритроцитів барана (дослід)

Строк дослідження	Контроль		Дослід	
	Дорослі миші	Старі миші	Дорослі миші	Старі миші
20 хв	344,9±135,1 (6)	144,0±86,9 (4)	666,5±236,9 (8)	116,9±98,5 (4)
3 год	51,8±33,9 * (6)	97,2±6,0 (6)	7,3±1,7 * (6)	62,6±19,7 (5)
4 доби	49,9±17,7* (6)	125,1±33,1 (4)	40,2±7,3*,** (5)	32,5±2,6*** (7)

Примітка. Тут і табл.2 у дужках – кількість мишей. * P<0,05 порівняно із 20 хв; **P<0,05 порівняно із 3 год; ***P<0,05 порівняно із контрольними старими мишами.

мишами (P<0,05). Через 4 доби після імунізації значення показника відповідали тим, що були у інтактних дорослих тварин.

У старих мишей, імунізованих ЕБ, концентрація мелатоніну істотно зменшилася через 4 доби порівняно не тільки зі старими інтактними (P<0,05), але й контрольними старими мишами. При цьому у останніх у всі строки досліджень значення показника істотно не відрізнялися від тих, що були у старих інтактних мишей (P>0,05).

Слід зазначити, що у старих мишей, імунізованих ЕБ, концентрація у крові мелатоніну через 20 хв і 3 год відрізнялася від значень показника у дорослих імунізованих мишей (P<0,05).

Отже, у дорослих мишей мелатонін-утворювальна функція епіфіза фазово змінюється у відповідь на введення Т-залежного антигена – ЕБ: посилюється через 20 хв, пригнічується через 3 год і відповідає стану інтактних мишей через 4 доби. У старих мишей реакція епіфіза на антигенний стимул змінюється і характеризується поступовим зменшенням концентрації мелатоніну у крові при розвитку імунної відповіді.

Наші результати досліджень коливань концентрації мелатоніну у крові дорослих імунізованих мишей узгоджуються з даними інших авторів, які встановили подібний характер фазових змін значень показника в епіфізах дорослих щурів у відповідь на

дію такого стресового чинника, як гіпотермія [5]. При цьому напрямок біохімічних змін попередників мелатоніну в епіфізах дорослих щурів за умов впливу стресу дав змогу цим авторам стверджувати про коливання у таких тварин саме продукції епіфізарного гормону. Оскільки мелатонін не накопичується в епіфізі, а одразу надходить із пінеалоцитів у кровообіг [15, 22], можна вважати, що встановлені нами зміни його концентрації у крові дорослих мишей при розвитку імунної відповіді на антигенний стимул, віддзеркалюють фазність коливань у таких мишей власне мелатонінотворювальної функції епіфіза, а не є проявом особливостей фармакокінетики гормону.

Існує думка, що посилення мелатонін-утворювальної функції епіфіза у ранні строки після дії стресу на організм є проявом адаптивних змін стану залози, які спрямовані на зміну активності гіпоталамо-гіпофізарно-надниркової системи [5]. Дійсно, ми встановили, що підвищення концентрації мелатоніну у крові дорослих мишей через 20 хв після введення ЕБ передумовлювало наступне істотне підвищення через 30 хв концентрації кортикостерону [10]. Із літературних джерел відомо, що підвищений вміст глюкокортикоїдів у крові забезпечує адекватну за інтенсивністю імунну реакцію і є одним із факторів імуноспецифічності [9, 19]. Крім

того, у дорослих імунізованих мишей одночасно із мелатоніном збільшувався у крові і вміст тимічного гормону, який також здатний підвищити концентрацію глюкокортикоїдів у крові [23]. В епітеліальному компоненті тимуса є рецептори до мелатоніну [21], а за нашими даними після інкубації мелатоніну зі строю тимуса дорослих мишей лінії СВА рівень ТСФ у супернатанті істотно збільшується [12]. Оскільки тимус є внутрішньосистемним регулятором, не виключено, що через зміну концентрації його гормонів узгоджується сила імунної відповіді з коливаннями освітлення і температури навколишнього середовища, а посередником у передачі цих сигналів на імунну систему є мелатонін.

Встановлене нами гальмування мелатонінутворювальної функції епіфіза у дорослих мишей через 3 год після дії антигенного стимулу, можливо, спрямоване на подальше обмеження надмірного збільшення у крові концентрації глюкокортикоїдів, які у великих дозах пригнічують розвиток імунної відповіді [9, 19]. Дані літератури свідчать не тільки про активуючий, але й стримувальний вплив мелатоніну на функцію надниркових залоз [12, 15]. За нашими попередніми даними, у дорослих імунізованих мишей лінії СВА через 3 год зменшується у крові і титр ТСФ до рівня інтактних мишей. Тобто, в ранні строки після введення Т-залежного антигена (індуктивна фаза імунної відповіді) зміни концентрації мелатоніну, кортикостерону і ТСФ односпрямовані. У продуктивну фазу імунної відповіді взаємовідношення цих гормонів дещо змінюються [10]. Ці дані ще раз підкреслюють складний і неоднозначний характер зв'язку функції епіфіза, тимуса і надниркових залоз при дії антигенного стимулу. Не виключено, що фазність коливань концентрації мелатоніну, ТСФ і кортикостерону при розвитку імунної відповіді забезпечує етапність і/або інтенсивність реакцій, які вони контролюють, а саме: міграція та проліферація лімфоїдних

клітин, синтез різних цитокінів тощо [9, 19].

Ми не встановили істотної вікової різниці в концентрації мелатоніну у крові інтактних мишей, що, можливо, пояснюється порою року, коли проводилося дослідження, та статтю тварин [8]. Разом з тим у старих мишей ми не спостерігали активуючого впливу імунізації на мелатонінутворювальну функцію епіфіза. Відсутність у старих мишей реакції епіфіза на антигенний стимул може пояснюватися не тільки структурними змінами в самій залозі, але й особливостями її зв'язку із функцією тимуса і надниркових залоз, в яких з віком також розвиваються морфофункціональні зміни [1, 14, 17, 19]. Так, у старих мишей лінії СВА після імунізації ЕБ вміст у крові ТСФ і кортикостерону не змінювався у відповідь на антигенний стимул [10]. Проте наша спроба поліпшити у таких мишей характер взаємовідношень тимуса і надниркових залоз за допомогою введення внутрішньосистемних регуляторів – біологічно активних факторів тимуса – не мала успіху [10]. Тому на наступному етапі роботи (2-га серія експериментів) ми використали підходи до корекції зв'язку цих залоз, які були спрямовані на надсистемні регуляторні структури, а саме епіфіз.

Було встановлено, що у старих тварин існує принципова можливість посилення мелатонінутворювальної функції епіфіза, незважаючи на те, що в ньому з віком розвиваються інволютивні зміни [4]. Ми також показали, що знижений вміст мелатоніну в епіфізах старих мишей лінії СВА істотно підвищувався після курсового введення пептидного фактора епіфіза епіталаміну і при цьому відповідав значенням показника у дорослих мишей [11]. Результати визначення вмісту ТСФ і кортикостерону в різні строки після імунізації ЕБ старих мишей, у яких мелатонінутворювальна функція епіфіза була посилена за допомогою епіталаміну, наведено в табл.2. У старих мишей контрольної групи титр ТСФ після ін'єкції ЕБ зали-

Таблиця 2. Вплив однієї ін'єкції 3 %-ї суспензії еритроцитів барана на динаміку змін титру тимічного сироваткового фактору (\log_2) і кортикостерону (нмоль/л) у сироватці крові старих мишей контрольної групи, а також старих мишей із посиленою функцією епіфіза

Строки досліджень після імунізації	Контроль	Дослід
Тимічний сироватковий фактор		
15 хв	4,1±0,7 (8)	6,4±0,6* (5)
1 доба	5,7±0,5 (6)	8,1±0,9* (6)
4 доба	5,6±0,3 (10)	7,2±0,5* (10)
Кортикостерон		
15 хв	67,8±5,9 (5)	96,3±11,5* (6)
1 доба	127,1±19,9** (6)	91,3±11,5 (6)
4 доба	86,3±8,7 (6)	96,2±13,5 (6)

Примітка. * $P < 0,05$ порівняно із контрольними мишами; ** $P < 0,05$ порівняно із 15 хв.

шається монотонним упродовж усього періоду досліджень ($P > 0,05$). При цьому у імунізованих старих мишей значення показника не відрізнялися від групи інтактних старих мишей [10]. Водночас імунізація ЕБ старих мишей із попередньо посиленою мелатонінутворювальною функцією епіфіза призвела до істотного збільшення титру ТСФ порівняно з контрольними старими тваринами в усі строки. Слід зазначити, що вже через 15 хв після імунізації вміст гормону істотно перевищував значення показника інтактних старих мишей [10].

Концентрація кортикостерону у крові старих мишей контрольної групи істотно збільшувалася через 1 добу після ін'єкції ЕБ, що відповідало даним, встановленим нами раніше. Імунізація ЕБ старих мишей із посиленою функцією епіфіза вже через 15 хв призвела до істотного підвищення у крові концентрації кортикостерону не тільки порівняно з імунізованими старими мишами контрольної групи, але й старими інтактними тваринами ($P < 0,05$) [10]. Між титром ТСФ і концентрацією кортикостерону у таких старих мишей є кореляційний зв'язок ($r = 0,69 \pm 0,15$, $P < 0,05$).

Таким чином, у старих мишей лінії СВА, у яких мелатонінутворювальна функція епіфіза була посилена, динаміка ендокринної функції тимуса та глюкокортикоїдної функції кори надниркових залоз після введення Т-залежного антигена нагадувала картину коливань титру ТСФ і вмісту глюкокортикоїдів у дорослих імунізованих мишей [10]. Відновлення фазових змін функції тимуса і кори надниркових залоз у старих мишей після імунізації збіглося з нормалізацією величини імунної відповіді у таких тварин [7]. Отримані результати підтверджують роль епіфіза в механізмах вікових змін адаптивних реакцій тимуса і кори надниркових залоз на антигенний стимул.

ВИСНОВКИ

1. У мишей лінії СВА з віком змінюється фазність реакції мелатонінутворювальної функції епіфіза на введення Т-залежного антигена.

2. Посилення у старих мишей мелатонінутворювальної функції епіфіза за допомогою пептидного фактора залози епіталаміну призвело до відновлення часової динаміки

вмісту тимічного гормону та кортикостерону у відповідь на антигенний стимул.

I.F. Labunets

AGE-RELATED PECULIARITIES OF MELATONIN-PRODUCING EPIPHYSEAL FUNCTION IN MICE IMMUNIZED BY T-DEPENDENT ANTIGEN: THE LINK WITH THYMUS AND ADRENAL CORTEX FUNCTION

It was investigated both melatonin blood level in the adult and old CBA-mice after immunization by sheep erythrocytes and the link between thymus and adrenal glands function in the old immunized mice with high melatonin content in the pineal gland. It has been revealed that in the adult mice blood melatonin level was influenced by the phase changes in dynamic of immunization, namely raised significantly in 20 min with following suppression after 3 hrs and rehabilitation up to normal in 4 days. In the old mice fluctuations of melatonin level were impaired and characterized by gradually decrease in dynamics of immunization. The increase of melatonin content in pineal gland by administration of epithalamine improved the dynamics of fluctuations of thymic hormone and corticosterone level in the immunized old mice.

Institute of Gerontology of AMS Ukraine

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Анисимов В.Н. Физиологические функции эпифиза. Геронтологический аспект // Рос. физиол. журн. им. И.М.Сеченова. – 1997. – **83**, № 8. – С. 1–13.
2. Арушанян Э.Б., Арушанян Л.Г. Эпифизарный мелатонин как антистрессорный агент // Эксперим. и клин. фармакология. – 1997. – **60**, № 6. – С. 71–77.
3. Бондаренко Л.А. Современные представления о физиологии эпифиза // Нейрофизиология. – 1997. – **29**, №3. – С. 212–237.
4. Бондаренко Л.А., Анисимов В.Н. Возрастные особенности влияния эпифиза на метаболизм серотонина в шишковидной железе у крыс // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 1992. – №2. – С. 194–195.
5. Бондаренко Л. А., Губина-Вакулик Г.И. Морфофункциональные изменения пинеальной железы в динамике адаптации к гипотермии // Рос. физиол. журн. им. И.М.Сеченова. – 2001. – **87**, №12. – С. 1643–1649.
6. Бутенко Г.М. Старение иммунной системы // Пробл. старения и долголетия. – 1998. – **7**, № 3. – С. 100–108.
7. Бутенко Г.М., Лабунец І.Ф., Магдич Л.В. та ін. Вплив гіперфункції епіфіза на стан імунної та ендокринної систем при старінні // Журн. АМН України. – 2003. – **9**, №3. – С.438–451.

Ін-т геронтології АМН України, Київ

8. Копылова Г.В., Лабунец И.Ф. Влияние фотопериодов на ультраструктуру пинеалоцитов мышей разного возраста: выявление мелатонина // Пробл. старения и долголетия. – 2004. – **13**, №4. – С. 486–493.
9. Корнева Е.А., Шхинек Э.К. Гормоны и иммунная система. – Л.: Наука. 1988. – 251 с.
10. Лабунец І.Ф. Вікові особливості функції тимуса та кори надниркових залоз у імунізованих Т-залежним антигеном мишей лінії СВА // Фізіол. журнал. – 2005. – **51**, № 1. – С. 77–83.
11. Лабунец И.Ф., Бутенко Г.М., Хавинсон В.Х. и др. Регулирующее влияние пептидов эпифиза на развитие Т-лимфоцитов у мышей линии СВА при старении: роль микроокружения органов иммунной системы и нейроэндокринных факторов // Успехи геронтологии. – 2003. – Вып. 12. – С. 111–120.
12. Лабунец И.Ф., Бутенко Г.М., Хавинсон В.Х. Влияние биологически активных факторов эпифиза на функцию тимуса и клеточный состав костного мозга и селезенки у мышей разного возраста // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 2004. – **137**, № 5. – С. 5811–583.
13. Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Высш. школа. 1973. – 343 с.
14. Магдич Л.В., Лабунец И.Ф., Терешина О.П. и др. Возрастные особенности взаимодействия тимуса и коры надпочечников // Пробл. старения и долголетия. – 2001. – **10**, № 4. – С. 345–351.
15. Малиновская Н.К. Роль мелатонина в организме человека //Клин.медицина. – 1998. – **76**, №10. – С. 15–22.
16. Хавинсон В.Х., Морозов В.Г. Пептиды эпифиза и тимуса в регуляции старения. – Спб.: ИКФ “Фолиант”. 2001. – 160 с.
17. Хмельницкий О.К., Ступина А.С. Функциональная морфология эндокринной системы при атеросклерозе и старении. – Л.: Медицина, 1989. – 248 с.
18. Bach J.F., Dardenne M., Bach M.A. Demonstration of a circulation thymic hormone in mouse and in man // Transplant. Proc. – 1973. – **1**, № 1. – P. 99–104.
19. Besedovsky H. J., del Rey A. Immunoneuroendocrine interactions: facts and hypotheses // Endocr. Rev. – 1996. – **17**, № 1. – P. 64–102.
20. Henning S.J. A sensitive and convenient method for measurement of corticosterone in rat serum //Steroids. – 1980. – **35**, №6. – P. 673–683.
21. Liu Z., Zhao Y.,Peng S. Identification of 2-[125I]indomelatonin binding sites in the thymus of mice and its significance // Sci.Chine B. – 1995. – **38**, № 12. – P. 1455–1461.
22. Reiter R.J. Experimental observations related to the utility of melatonin in attenuating age-related diseases // Adv. Gerontology (St.-Peterburg). – 1999. – №3. – P. 121–132.
23. Savino W., Dardenne M. Neuroendocrine control of thymus physiology // Endocrine Reviews. – 2000. – **21**, №4. – P. 412–443.

Матеріал надійшов до редакції 27.04.2005