

2. *Заморський І.І.* Фотоперіодичний компонент механізмів адаптації до гострої гіпоксії: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. – К., 2000. – 35 с. 3. *Мецишен І.Ф.* Метод визначення окислювальної модифікації білків плазми (сироватки) крові // Бук. мед. вісник. – 1998. – Т. 2, № 1. – С. 156–158. 4. *Гіпоксія* та індивідуальні особливості реактивності / Березовський В.А., Бойко К.А., Клименко К.С. і др. / Под общ. ред. В.А.Березовского. – К.: Наук. думка, 1978. – 216 с. 5. *Заморський І.І., Пішак В.П.* Влияние мелатонина на содержание циклических нуклеотидов и интенсивность ПОЛ в гиппокампе и габенуле головного мозга крыс при острой гипоксии // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 2000. – Т. 130, № 8. – С. 168–171. 6. *Мецишен І.Ф.* Механизм действия четвертичных аммониевых соединений (этония, тиония, додекония и их производных) на обмен веществ в норме и патологии: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. – К., 1991. – 37 с. 7. *Михайлов И. Б.* Настольная книга врача по клинической фармакологии. – СПб: Фолиант, 2001. – 736 с. 8. *Окислительная модификация белков сыворотки крови человека, метод ее определения* / Дубинина Е.Е., Бурмистров С.О., Ходов Д.А., Порохов И.Г. // Вопр. мед. химии. – 1995. – Т. 41, вып. 1. – С. 24–26. 9. *Стальная И. Д., Гаривили Т. Г.* Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты // Современные методы в биохимии / Под ред. В. Н. Ореховича. – М.: Медицина, 1977. – С. 66–68. 10. *Free radical scavenging effects of melatonin and serotonin: possible mechanism* / Daniels W.M. U., van Rensburg S. J., van Zyl J. M., et al. // NeuroReport. – 1996. – 7, N 10. – P. 1593–1596. 11. *Melatonin protects LDL from oxidation but does not prevent the apolipoprotein derivatization* / Pieri C., Marra M., Gaspar R., Damjanovich S. // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1996. – Vol. 222, N 2. – P. 256–260. 12. *Michel H.S., Oliver C.N., Starke-Reed P.E.* Protein oxidation and myelinolysis occur in brain following rapid correction of hyponatremia // Biochem. Biophys. Res. Com. – 1990. – Vol. 172, N 1. – P. 92–97.

THE FEATURES OF ANTIOXIDANT ACTION OF MELATONIN IN THE FOREBRAIN OF RATS UNDER ACUTE HYPOXIA

I.I.Zamorskyi, I.Y.Sopova, N.D.Filipets

Abstract. This paper presents the results of antioxidant action of melatonin in the cerebral cortex and hippocampus of the brain of juvenile male rats under acute hypobaric hypoxia. The antioxidant action of melatonin was estimated on parameters of the contents of products of lipide peroxidation (malonic aldehyde) and protein peroxidation (the products of the oxidative modification of proteins), and activity main antioxidant enzyme of neurones — glutathione peroxidase. It was established that melatonin raised the activity of glutathione peroxidase, reduced the intensity of lipide peroxidation in normoxic animals, and eliminated a disbalance of the prooxidant-antioxidant homeostasis at the acute hypoxia especially in a hippocampus. At the same time the melatonin administration enhanced protein peroxidation in a hippocampus.

Key words: melatonin, antioxidant action, acute hypobaric hypoxia, cerebral cortex, and hippocampus.

Bukovinian State Medical Academy (Chernivtsi)

Надійшла до редакції 7.06.2002 року

УДК 612.826.33.017.2:612.67.017.1

О.І.Захарчук

ГЕРОНТОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ ВПЛИВУ ШИШКОПОДІБНОГО ТІЛА НА ХРОНОРИТМИ ІМУНОСТРУКТУРНОГО ГОМЕОСТАЗУ

Кафедра медичної біології і генетики (зав. - проф. В.П.Пішак)
Буковинської державної медичної академії

Резюме. Вивчено вплив епіфізектомії на біоритмологічний профіль показників неспецифічної імунологічної адаптації при старінні організму. Отримані результати дають можливість висунути припущення про прямий вплив шишкоподібного тіла на циркадіанні та сезонні ритми показників неспецифічного імунітету у ссавців. Зроблена спроба за допомогою екзогенного мелатоніну ліквідувати порушення архітектоніки хроноритмів, які особливо є вираженими при старінні організму.

Ключові слова: епіфізектомія, хроноритми, шишкоподібне тіло, неспецифічний імунітет, мелатонін, старіння.

Вступ. Шишкоподібне тіло (епіфіз) відіграє важливу роль у синхронізації циркадіанної ендокринної активності у людини та ссавців. У наукових дослідженнях останніх років увага приділяється ролі шишкоподібного тіла в нейроендокринній регуляції функцій організму [1,2,3,10] та вивченню участі епіфіза в розвитку загального адаптаційного синдрому [1,3,4]. Зацікавленість викликає вивчення участі пінеальної залози, як одного з основних осциляторів [6,10], в регуляції хронобіологічних процесів організму [1,3]. Доведено, що при старінні циркадіанні і сезонні коливання показників життєдіяльності організму поступово згасають [5], акрофази стають менш стабільними.

Літературні відомості вказують на виконання шишкоподібним тілом ролі центрального біологічного годинника при старінні [8], а введення мелатоніну в фармакологічних дозах може запобігти розвитку симптомів старіння [6,7]. Доведено стимулювальний вплив мелатоніну на імуноструктурний гомеостаз [9]. Вивчені сезонні коливання деяких показників неспецифічної імунологічної адаптації. Водночас, у літературі відсутні дані щодо ролі шишкоподібного тіла в регуляції сезонних змін циркадіанних ритмів показників неспецифічної імунологічної адаптації організму. Практично залишаються не вивченими геронтологічні аспекти циркадіанних та сезонних ритмів показників імуноструктурного гомеостазу, не досліджені механізми впливу зміненого освітлення на функції системи неспецифічного імунологічного захисту.

Мета дослідження. Вивчити вплив епіфізектомії на особливості динаміки циркадіанних і сезонних ритмів показників неспецифічної імунологічної адаптації організму та виявити характер впливу шишкоподібного тіла на ритмостаз показників природного неспецифічного імунітету при старінні організму.

Матеріал і методи. Експерименти проведені на 160 білих лабораторних щурах-самцях лінії Wistar двох вікових груп: статевозрілих (дорослих) - віком 12-15 міс. масою 140-200 г та старих - віком 24 міс. і старших масою 250 г і більше.

Тварини цілий рік утримувалися у віварії при сталій температурі та штучному освітленні. Світловий режим був відповідно: 12 год світло - 12 год темрява. У всі періоди дослідження щури знаходилися на постійному кормовому режимі з вільним доступом до води. Експериментальні дослідження проводилися в різні години доби та в різні пори року.

У дослід брали псевдооперованих щурів, які поряд з інтактними, склали контрольну групу та епіфізектомованих тварин на 15-20-ту добу після видалення пінеальної залози. Епіфізектомію у щурів проводили за методом Y.Kitay і M.Altshule (1954) в модифікації В.П.Пішака (1974).

Для вивчення циркадіанних ритмів показників неспецифічної імунологічної адаптації організму досліді проводилися на дорослих та старих щурах-самцях, які утримувалися при світловому режимі: 12 год світло - 12 год темрява. Світлий період продовжувався з 08.00 год ранку до 20.00 год вечора, а темновий - з 20.00 год вечора до 08.00 год ранку. Кров забирали через 6-годинні інтервали доби: відповідно о 09.00, 15.00, 21.00 та 03.00 годині. Для характеристики сезонного ритму досліді проводили впродовж двох років навесні (квітень, травень), влітку (липень, серпень), восени (жовтень, листопад) та взимку (січень, лютий).

З метою вивчення ефекту дії на функцію системи неспецифічної адаптації організму гормону шишкоподібного тіла мелатоніну епіфізектомованим та контрольним щурам вводили внутрішньоочеревинно синтетичний мелатонін у дозі 100 мкг на 100 г маси тіла, розведений 0,2 мл ізотонічного розчину хлориду натрію.

Для визначення впливу зміненого освітлення тварин утримували за умов регульованого світлового режиму: 72 год - темрява та 72 год - світло. Визначали показники функціонування системи природного імунітету. Вводили внутрішньоочеревинно мелатонін і через 1-1,5 год, враховуючи період напіврозпаду (G.Usaughan et al., 1986), проводили дослідження впливу мелатоніну на показники неспецифічної імунологічної адаптації.

Для вивчення показників неспецифічної імунологічної адаптації у щурів досліджували: активність сироваткового комплементу, яку визначали фотометричним методом за 50%-ним гемолізом (од/мл), концентрацію сироваткового лізоциму (мкг/мл) визначали турбодиметричним методом за Перрі в модифікації Грант (1983), загальну кількість лейкоцитів (10⁹/л) периферичної крові визначали за А.Я.Альтгаузен (1964), НСТ-тест (%) визначали за С.У.Пастером (1989), мілопероксидазну активність нейтрофілів (од) досліджували за методом Т.Попова і Л.Нейковської (1971), рівень глікогену (од) в лейкоцитах визначали за І.Тодоровим (1966), фагоцитарну активність (%) і фагоцитарний індекс (од) поліморфноядерних лейкоцитів вивчали в присутності об'єкта фагоцитозу (жива добова культура стафілокока) (Э.У.Пастер і соавт., 1989).

Результати, отримані в ході експериментальних досліджень, математично проаналізовані з визначенням середнього значення, стандартного відхилення від середнього значення, вірогідності різниць між середніми величинами за критерієм Стюдента. Вся обробка цифрового матеріалу проведена за допомогою програми MS Excel* 2000 Pro.

Результати досліджень та їх обговорення. За результатами проведених досліджень всі показники, що мали характерні сезонні зміни циркадіанного ритму,

в тій чи іншій мірі залежали від наявності шишкоподібного тіла. Встановлено характерні вікові відмінності.

Циркадіанний ритм сироваткового комплементу найбільш характерних змін зазнавав навесні. Рівень показника внаслідок епіфізектомії знижувався, особливо вночі, як у дорослих, так і в старих шурів. В останніх зменшувалась амплітуда коливань. Після видалення шишкоподібного тіла сезонний ритм мав низьку амплітуду, зменшувався мезор, знижувався рівень показника у старих шурів. Після введення мелатоніну комплементарна активність зростала у всіх групах тварин. Постійне світло призводило до гальмування активності сироваткового комплементу, а введення екзогенного мелатоніну нормалізувало цей показник. За умов постійної темряви мелатонін викликав зростання активності комплементу в епіфізектомованих дорослих та старих шурів.

Таким чином, наші дослідження вказують на наявність ритміки системи комплементу та зниження його внаслідок епіфізектомії. Нами досліджено, що циркадіанний ритм активності сироваткового комплементу залежить не тільки від віку тварин та цілісності шишкоподібного тіла, але і від сезону, що особливо характерно навесні і влітку. Система комплементу, як один із показників неспецифічної адаптації, що тісно пов'язана з функціонуванням імунної системи, має вагому залежність від пінеальної регуляції, про що свідчать середньодобові та середньорічні показники.

Вміст сироваткового лізоциму у дорослих шурів після пінеалектомії зменшувався, у старих - зростав, також спостерігалось нівелювання циркадіанного ритму. Сезонний ритм внаслідок видалення пінеальної залози змінювався: у старих шурів мініфаза зміщувалась на осінь. Введення мелатоніну супроводжувалося зростанням вмісту лізоциму в контрольних групах дорослих і старих шурів, а в епіфізектомованих дорослих - зменшенням рівня показника. Не виявлено істотних змін вмісту сироваткового лізоциму за умов тривалого освітлення або темряви. Слід вказати на суттєву роль лізоциму, вміст якого зростав при старінні (T.Fulop et al., 1989), що є компенсаторним механізмом, направленим на активацію ферментативної активності фагоцитів, і, насамперед, лізосомального ферменту - муромідази, що розкладає стінки бактерій.

Певною мірою стан неспецифічної імунологічної адаптації організму характеризує загальна кількість лейкоцитів периферичної крові. Після пінеалектомії спостерігалась деяка лейкопенія як у дорослих, так і в старих шурів. Зменшувалась фазність циркадіанного ритму, зміщувалися акрофаза і мініфаза. Сезонний ритм лейкоцитів у старих тварин виявлявся слабо, внаслідок видалення шишкоподібного тіла спостерігалось зміщення його акрофази на осінь, а фаза мінімуму зсувалася на весну. Не виявлено істотних відмінностей у загальній кількості лейкоцитів після введення мелатоніну та при порушенні фотоперіоду. Отже, показник кількості лейкоцитів не є достеменно інформативним щодо дії мелатоніну та зміненого освітлення, однак динаміка та ритмостаз змінювалися, що збігається з літературними даними [1,3].

Циркадіанний ритм НСТ-тесту в дорослих епіфізектомованих шурів не відрізнявся від контрольних груп. Суттєвим було зниження рівня показника як у контролі, так і, особливо, у старих епіфізектомованих тварин. Причому у них зменшувалась амплітуда циркадіанного ритму, змінювалася акрофаза з 21.00 год у контролі на 03.00 год у досліді. Введення мелатоніну дорослим тваринам викликало зниження даних показника НСТ-тесту в контролі та нормалізувало в пінеалектомованих. У старих шурів мелатонін викликав збільшення рівня НСТ-тесту у всіх групах. НСТ-тест у тварин, що перебували при тривалому освітленні, зазнавав істотних змін тільки у старих шурів. Після введення мелатоніну мала місце тенденція до зростання рівня НСТ-тесту в статевозрілих та статистично вірогідно збільшувався показник у старих епіфізектомованих шурів. Як і кількість лейкоцитів, НСТ-тест залишався істотно не зміненим при перебуванні тварин за умов тривалої темряви. За даних умов не спостерігалось впливу мелатоніну. Загальновідомо, що НСТ-тест характеризує активацію метаболізму нейтрофілів і, насамперед, функцію гексозо-монофосфатного шунта та пов'язаний з ним синтез вільних радикалів, необхідних для успішного здійснення фагоцитозу. Мала місце тенденція до зміни цього показника з віком та порушення циркадіанної ритміки. Це дало змогу передбачити можливість залежності ритмостазу та динаміки показників фагоцитозу від пінеальних факторів.

Циркадіанний ритм вмісту глікогену в нейтрофілах у статевозрілих шурів після епіфізектомії суттєвих відмінностей не мав, а в старих - вірогідно знижу-

вався та згладжувалася амплітуда коливань у тварин з видаленим шишкоподібним тілом. Введення мелатоніну супроводжувалося зростанням вмісту глікогену в пінеалектомованих дорослих і старих щурів. У статевозрілих тварин при тривалому освітленні рівень глікогену в нейтрофілах складав 53 од., а за умов звичайного фотоперіоду дорівнював 63 од. У всіх трьох групах старих щурів при постійному освітленні, як і при звичайному світловому режимі, кількість глікогену була значно нижчою ($P < 0,05$), ніж у дорослих. Введення мелатоніну нормалізувало рівень показника як у контрольних, так і в пінеалектомованих щурів. Аналогічна направленість мала місце й у старих тварин як до, так і після введення мелатоніну. Водночас, з віком цей показник становив тільки 70% рівня у дорослих тварин. Знижений під дією постійної темряви вміст глікогену в епіфізектомованих дорослих і старих щурів нормалізувався після ін'єкцій екзогенного мелатоніну.

Варто вказати, що низький вміст глікогену в піддослідних тварин свідчить про недостатню енергозабезпеченість нейтрофілів, як основного ланцюга у функціонуванні системи неспецифічної імунологічної адаптації організму, і про можливі відхилення в роботі системи неспецифічного імунологічного захисту, що є особливо характерним при старінні.

Функція нейтрофілів залежить не тільки від енергозабезпечення. Важливими моментами є бактерицидні властивості та зруйнування пероксиду водню, що обумовлено мієлопероксидазною активністю нейтрофілів периферичної крові. Циркадіанний ритм активності мієлопероксидази характеризувався мініфазою в ранковий час у всіх трьох групах старих щурів. Поряд з цим, акрофаза показника зміщувалася з 03.00 год у дорослих на 21.00 год у старих тварин у контролі та досліді. Особливо низькою залишалася активність ферменту у всі добові періоди у старих пінеалектомованих щурів. Суттєвих вікових змін зазнавав цей показник залежно від пори року. Це стосується, в першу чергу, епіфізектомованих тварин, у яких мієлопероксидазна активність знижувалася, а характер кривої зазнавав змін у бік зменшення мезора. Зазначена низька активність мієлопероксидази нормалізувалася під впливом мелатоніну за умов звичайного фотоперіоду, тривалої темряви та постійного освітлення.

Експериментальні дані вказують, що в результаті пінеалектомії зазнають змін показники вмісту глікогену, рівня НСТ-тесту та мієлопероксидазної активності, що є прямим свідченням зміни за цих умов фагоцитарної активності сегментоядерних нейтрофільних лейкоцитів.

Циркадіанний ритм фагоцитарної активності нейтрофілів навесні у дорослих епіфізектомованих щурів характеризувався змищенням фаз максимуму і мінімуму, дещо знижувався рівень показника. У старих тварин вірогідно знижувалася фагоцитарна активність, а видалення шишкоподібного тіла призводило до порушення фазності добової кривої, показники вірогідно знижувалися і у всі часові проміжки доби. Зазнавала певних змін фагоцитарна активність залежно від сезону. Мініфаза припадала на весну, акрофаза ресструвалася взимку. Внаслідок пінеалектомії характер сезонного ритму не мав відмінностей, рівень показника знижувався.

Ін'єкції мелатоніну нормалізували знижені показники фагоцитарної активності як у дорослих, так і в старих щурів, а при наявності залози - гормон не впливав на цей показник при звичайному фотоперіоді.

За умов пригнічення функції шишкоподібного тіла при тривалому освітленні введення мелатоніну стимулювало активність фагоцитозу як у дорослих, так і в старих контрольних тварин. Така ж направленість змін спостерігалася в обох групах епіфізектомованих щурів. Отже, за відсутності пінеальної залози ефекти мелатоніну не залежать від фотоперіоду.

Після тривалої темряви введення мелатоніну призводило до певного зниження рівня фагоцитозу в контрольних дорослих і старих щурів, а в пінеалектомованих мала місце тенденція до стимуляції фагоцитарної активності, особливо у старих тварин.

Фагоцитарний індекс у дорослих щурів після видалення шишкоподібного тіла характеризувався порушенням фазності циркадіанного ритму, змищенням акрофази на ранковий час. Зареєстровано зниження ритмічних коливань і вірогідне зменшення показника в старих епіфізектомованих тварин. У дорослих щурів без шишкоподібного тіла акрофаза сезонного ритму зміщувалася на осінь, мініфаза - на зиму. Середньорічний показник знижувався як у дорослих, так і в старих пінеалектомованих щурів, в яких мініфаза ресструвалася навесні.

Екзогенний мелатонін нормалізував рівень фагоцитарного індексу, котрий був знижений внаслідок видалення пінеальної залози та після дії постійного освітлення.

Фагоцитарна реакція, як центральний ланцюг системи неспецифічної імунологічної адаптації організму, є інтегративним показником і належить до найбільш функціонально активних механізмів захисту. Очевидно, що при порушенні певних ланок системи неспецифічної імунологічної адаптації організму, компенсація здійснюється механізмом фагоцитозу.

Виявлена різнонаправленість біоритмологічних змін гуморальних і клітинних показників, на нашу думку, забезпечує найбільш повноцінне пристосування організму до циклічних змін зовнішнього середовища. Шишкоподібне тіло у ссавців причетне до регуляції циркадіанних ритмів системи неспецифічної імунологічної адаптації організму, цей вплив має вікові особливості і зберігається до глибокої старості. Регульовальна дія пінеальної залози на імуноструктурний гомеостаз здійснюється мелатоніном і, очевидно, іншими біологічно-активними речовинами, що продукуються цим органом. Результати дослідів із зміненим освітленням свідчать, що існує принципова можливість стимуляції мелатонінутворюючої функції шишкоподібного тіла шляхом збільшення довжини темпового періоду, і, як наслідок, посилення роботи системи неспецифічної імунологічної адаптації організму, що є особливо актуально в геронтологічній практиці.

Врахування подібності та різниці біологічних ритмів дозволить з'ясувати особливості становлення механізмів адаптації до навколишнього середовища, формування захисних реакцій, динаміку процесів компенсації і відновлення порушених функцій. Крім цього, є можливість підійти до об'єкту вибору об'єкта при моделюванні патологічних процесів. Такий підхід значно підвищить вірогідність отриманих результатів та знизить ступінь ризику при екстраполяції цих даних на людину, може стати основою подальшої розробки найбільш оптимальних схем корекції десинхронозів показників системи неспецифічної імунологічної адаптації організму.

Уточнення механізмів пінеальних ефектів вимагає більш широкого використання біологічних об'єктів, комплексного дослідження показників імуноструктурного гомеостазу з урахуванням сучасних методів і теоретичних положень імунобіології, біохімії, ендокринології та молекулярної біології.

Висновки.

1. Гуморальні та клітинні складові системи неспецифічної імунологічної адаптації організму виявляють чіткі циркадіанні та сезонні коливання з певними віковими особливостями.

2. Шишкоподібне тіло бере безпосередню участь у формуванні хроноритмів системи неспецифічного імунного захисту, що чітко підтверджується відповідними змінами після еліфізектомії або введення мелатоніну.

3. Стан циркадіанної архітектоники імуноструктурного гомеостазу має пряму залежність від довжини фотоперіоду: за умов подовженої темряви спостерігається активація системи неспецифічного імунного захисту, а при постійному освітленні – відбувається пригнічення. Це зумовлює можливість часткової корекції показників системи неспецифічної імунологічної адаптації під час розвитку процесів старіння організму шляхом штучної регуляції світлового режиму.

Література. 1. *Комаров Ф.И., Рапопорт С.И.* Хронобиология и хрономедицина. – М.: Триада-Х, 2000. – 488 с. 2. *Пишак В.П.* Клінічна анатомія шишкоподібного тіла. – Тернопіль: Укрмедкнига, 2000. – 160с. 3. *Пишак В.П., Захарчук О.І., Пишак О.В.* Шишкоподібне тіло і хроноритми імунної системи. – Чернівці: Прут, 1997. – 270 с. 4. *Слепушкин В.Д., Пашинский В.Г.* Эпифиз и адаптация организма. – Томск: Изд-во Томск. ун-та, 1982. – 212 с. 5. *Фралькис В.В.* Стресс-возраст-синдром // Физиол. ж. – 1991. – Т.37, №3. – С.3-11. 6. *Arendt J.* Melatonin and mammalian pineal gland. – Chapman & Hall. – 1995. – 321 p. 7. *Armstrong S.M.* Melatonin: The internal Zeitgeber of mammals? // Pineal Res. Rev. – 1989. – Vol.7, №2. – P.157-202. 8. *Kloeden P.E., Rossler R., Rossler O.E.* Does a centralized clock for ageing exist? // Gerontology (Schweiz.). – 1999. – Vol.36, №5-6. – P. 314-322. 9. *Maestroni G.I.M., Cinti A., Pierpaoli W.* Role of the pineal gland in immuniti // Second Intern. Workshop on NIM. Scientific Programme and Abstracts. – Dubrovnik, 1986. – №13. – P.6-10. 10. *Srinivasan V.* The Pineal gland: Its physiological and pharmacological role // Indian. J. Physiol. And Pharmacol. – 1989. – Vol.33, №4. – P.263-272. 10.

GERONTOLOGICAL ASPECTS OF THE INFLUENCE OF THE PINEAL GLAND ON THE CHRONORHYTHMS OF IMUNOSTRUCTURAL HOMEOSTASIS

O.I.Zakharchuk

Abstract. The effect of epiphysectomy on the biorhythmologic profile of the non-specific immunological adaptation parameters in case of organism aging has been studied. The obtained

results enable to make a suggestion concerning a direct influence of the pineal body on the circadian and seasonal rhythms of the nonspecific immunity parameters in mammals. An attempt has been made to eliminate chronorhythmologic architechtonics disorders by means of exogenons melatonin that are especially evident in case of organism aging.

Key words: epiphysectomy, chronorhythms, pineal gland, non-specific immunity, melatonin, aging.

Bukovinian State Medical Academy (Chernivtsi)

Надійшла до редакції 8.06.2002 року