

УДК 612.826.33.017.2:612.67.017.1

О. І. Захарчук
Ю. М. Вепрюк
М. І. Грицюк

Буковинська державна медична академія,
м. Чернівці

ВПЛИВ ШИШКОПОДІБНОГО ТІЛА НА БІОРИТМОЛОГІЧНИЙ ПРОФІЛЬ ПОКАЗНИКІВ НЕСПЕЦИФІЧНОГО ІМУНІТЕТУ ПРИ СТАРІННІ ОРГАНІЗМУ

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

Резюме. Приведені результати біоритмологічного профілю показників неспецифічної імунологічної адаптації організму після видалення шишкоподібного тіла в старих щурів. За наслідками отриманих результатів висловлено припущення про прямий вплив шишкоподібного тіла на циркадіанні та сезонні ритми показників неспецифічного імунітету в ссавців. Експериментальне введення екзогенного мелатоніну підвилювало порушення архітектоніки хроноритмів, що були змінені внаслідок перебігу процесів старіння.

Вступ

У людини та ссавців шишкоподібне тіло (епіфіз, пінеальна залоза) відіграє важливу роль у синхронізації циркадіанної ендокринної активності. Наукові дослідження останніх років досить глибоко засвідчують про роль шишкоподібного тіла в нейроендокринній регуляції функцій організму [1-4,12] та вивченню участі епіфіза в розвитку загального адаптаційного синдрому [1,3]. Велику зацікавленість викликає вивчення ролі пінеальної залози як одного з основних осциляторів [7,12], в регуляції хронобіологічних процесів організму [1,3,4]. Доведено, що при старінні циркадіанні і сезонні коливання показників життєдіяльності організму поступово згасають [5,6], акрофази стають менш стабільними. З віком помітне зниження продукції та секреції епіфізом мелатоніну, зменшення добового коливання рівня мелатоніну в плазмі крові [13-16], що призводить до розвитку різноманітних патологічних станів, особливо внаслідок зростання реактивності симпат-адреналової, гіпофізарно-адреналової та серцево-судинної систем. Відновлення ж концентрації мелатоніну суттєво підвищує стійкість серцево-судинної та інших систем організму до стрессорного впливу [5,6].

Доведений позитивний вплив мелатоніну на нейроендокринну регуляцію, а також його антиоксидантна дія [11]. Знижуючи активність гіпоталамо-гіпофізарної та симпат-адреналової систем, мелатонін зменшує початкову стадію розвитку стресу – стадію тривоги або неспокою [10], таким чином запобігаючи розвитку загального адаптаційного синдрому.

Дані літератури вказують на роль шишкоподібного тіла як центрального біологічного годинника при старінні [8], а введення мелатоніну у фармакологічних дозах може попередити розвиток симптомів старіння [5-7]. Доведений стимулювальний вплив мелатоніну на імуоструктурний гомеостаз [9]. Вивчені сезонні коливання деяких показників неспецифічної імунологічної адаптації. Поряд з тим, у літературі відсутні дані щодо ролі шишкоподібного тіла в регуляції сезонних змін циркадіанних ритмів показників неспецифічної імунологічної адаптації організму. Потребують більш досконалого вивчення геронтологічні аспекти циркадіанних та сезонних ритмів показників імуоструктурного гомеостазу, в стадії розробки знаходяться дослідження механізмів впливу зміненого освітлення на функції системи неспецифічного імунітету організму.

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 та за умов зміненого фотоперіоду.

МАТЕРІАЛ І МЕТОДИ

Дослідження проведені на 140 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.

Щури цілий рік утримувалися у віварії при сталій температурі та штучному освітленні. Світловий режим становив 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 дослідженнях використовували псевдооперованих щурів, які поряд з інтактними, склали контрольну групу, та епіфізектомованих тварин на 15-20 добу після видалення пінеальної залози. Епіфізектомію в щурів проводили по Y.Kitay і M.Altshule (1954) в модифікації В.П. Пішака (1974).

З метою вивчення циркадіанних ритмів показників неспецифічної імунологічної адаптації організму досліди проводили на дорослих та старих щурах-самцях, яких утримували 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 06.00 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 досліди проводили впродовж двох років навесні (квітень, травень), влітку (липень, серпень), восени (жовтень, листопад) та взимку (січень, лютий).

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

У частини тварин вивчали також вплив зміненого освітлення на показники функціонування системи неспецифічного імунітету шляхом утримання цих тварин за умов регульованого світлового режиму: 72 год – темрява та 72 год – світло. Вводили внутрішньоочеревинно мелатонін і через 1-1,5 год, враховуючи період напіврозпаду (G. Uaughan et al., 1986).

Вивчали такі показники неспецифічної імунологічної адаптації: активність сироваткового комплементу, яку визначали фотометричним методом за 50% гемолізом (од/мл); концентрацію сироваткового лізоциму (мкг/мл) визначали турбодиметричним методом за Перрі в модифікації Грант (1983); загальну кількість лейкоцитів ($10^9/л$) периферичної крові визначали за методом А.Я.Альтгаузена (1964); НСТ-тест (%) визначали за методом С.У.Пастера (1989); мієлопероксидазну активність нейтрофілів (од) дослі-

джували за методом Т.Попова і Л.Нейковської (1971); рівень глікогену (од) в лейкоцитах визначали за методом І.Тодорова (1966); фагоцитарну активність (%) і фагоцитарний індекс (од) поліморфноядерних лейкоцитів вивчали в присутності об'єкта фагоцитозу (жива добова культура стафілококу) (Э.У.Пастер и 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 Стьюдента. Вся обробка цифрового матеріалу проведена за допомогою програми MS Excel 2000 Pro.

ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Згідно результатів проведених досліджень всі показники, що мали характерні сезонні зміни циркадіанного ритму тією чи іншою мірою залежали від наявності шишкоподібного тіла. При цьому 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 у старих щурів. В останніх зменшувалась амплітуда коливань. Після видалення шишкоподібного тіла сезонний ритм мав низьку амплітуду, зменшувався мезор. Знижувався рівень показника в старих щурів. Після введення мелатоніну комплементарна активність зростала в усіх групах тварин. Постійне світло призводило до зниження активності сироваткового комплементу, а введення екзогенного мелатоніну нормалізувало цей показник. За умов постійної темряви мелатонін викликав зростання активності комплементу в епіфізектомованих дорослих та старих щурів.

Таким чином, наші дослідження вказують на наявність ритміки системи комплементу та зниження його внаслідок епіфізектомії. Показано, що циркадіанний ритм активності сироваткового комплементу залежить не тільки від віку тварин та цілісності шишкоподібного тіла, але й 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 в дорослих щурів після пінеалектомії зменшувався, в старих – зростав, також спостерігалось нівелювання циркадіанного ритму. Сезонний ритм внаслідок видалення пінеальної залози змінювався: в старих щурів мініфаза зміщувалася на осінь. Вве-

дення мелатоніну супроводжувалося зростанням вмісту лізоциму в контрольних групах дорослих і старих щурів, а у 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 зростає 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.

У певній мірі стан неспецифічної імунологічної адаптації організму характеризує загальна кількість лейкоцитів периферичної крові. Після пінеалектомії спостерігалася деяка лейкопенія, як у дорослих, так і в старих щурів. Зменшувалася фазність циркадіанного ритму, зміщувалися акрофаза і мініфаза. Сезонний ритм лейкоцитів у старих тварин виявлявся слабо, внаслідок видалення шишкоподібного тіла спостерігалася зміщення його акрофази на осінь, а фаза мінімуму зсувалася на весну. Не виявлено істотних відмінностей в 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 співпадає з літературними даними [1,4].

Циркадіанний ритм НСТ-тесту в дорослих епіфізектомованих щурів не відрізнявся від контрольних груп. Суттєвим було зниження рівня показника, в контролі і, особливо, в старих епіфізектомованих тварин. У них зменшувалася амплітуда циркадіанного ритму, змінювалася акрофаза з 21.00 год у контролі на 03.00 год в досліді. Введення мелатоніну дорослим тваринам викликало зниження даних показника НСТ-тесту в контролі та нормалізувало в пінеалектомованих. У старих щурів мелатонін викликав збільшення рівня НСТ-тесту в усіх групах. НСТ-тест у тварин, що перебували при тривалому освітленні, зазнавав істотних змін тільки в старих щурів. Після введення мелатоніну мала місце тенденція до зростання рівня НСТ-тесту в статевозрілих, та статистично вірогідно збільшувався показник у старих епіфізектомованих щурів. Як і кількість лейкоцитів, НСТ-тест залишався істотно незмінним при перебуванні тварин за умов тривалої темряви. За даних умов не спостерігалася впливу мелатоніну. Загальновідомо, що НСТ-тест характеризує активацію метаболізму нейтрофілів і, насамперед, функцію гексозомонофосфатного шунта та пов'язаний з ним синтез вільних ради-

калів, необхідних для успішного здійснення фагоцитозу. В наших дослідях мала місце тенденція до зміни цього показника з віком та порушення циркадіанної ритміки. Це дало змогу передбачити можливу залежність ритмостаза та динаміки показників фагоцитозу від пінеальних факторів.

Циркадіанний ритм вмісту глікогену в нейтрофілах у статевозрілих щурів після епіфізектомії суттєвих відмінностей не мав, а у старих – вірогідно знижувався, та згладжувалася амплітуда коливань у тварин з видаленням шишкоподібним тілом. Введення мелатоніну супроводжувалося зростанням вмісту глікогену в пінеалектомованих дорослих і старих щурів. У статевозрілих тварин при тривалому освітленні рівень глікогену в нейтрофілах становив 53 од, а за умов звичайного фотоперіоду дорівнював 63 од. У 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 і в старих тварин, як до, так і після введення мелатоніну. Разом з тим, 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.

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.

Циркадіанний ритм активності мієлопероксидази характеризувався мініфазою в ранковий час у 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 в усі добові періоди в старих пінеалектомованих щурів. Суттєвих вікових змін зазнавав цей показник і залежно від пори року. Це стоєть насамперед 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.

Навколдобовий ритм фагоцитарної активності нейтрофілів навесні в дорослих епіфізектомованих щурів характеризувався зміщенням 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 в усі часові проміжки доби. Зазнавала певних змін фагоцитарна активність залежно від сезону. Мініфаза припадала на весну, акрофаза реєструвалася взимку. Внаслідок пінеалектомії характер сезонного ритму не мав відмінностей, рівень показника знижувався.

Введення мелатоніну нормалізувало 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, при відсутності пінеальної залози ефекти мелатоніну не залежать від фотоперіоду.

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

Фагоцитарний індекс у дорослих щурів після видалення шишкоподібного тіла характеризувався порушенням фазності циркадіаного ритму, зміщенням 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, поряд з цим, мініфаза реєструвалася навесні.

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

дії постійного освітлення. Поряд з відсутністю ефекту дії постійної темряви та мелатоніну на динаміку та ритмостаз фагоцитарного індексу у дорослих щурів, для старих тварин характерним було зростання показника в контролі. Мелатонін, однак, викликав зменшення показника в контролі та збільшення до нормальних величин у групі піддослідних тварин.

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.

Таким чином, виявлена різнонаправленість біоритмологічних змін гуморальних і клітинних показників, на нашу думку, забезпечує найбільш повноцінне пристосування організму до циклічних змін зовнішнього середовища. Шишкоподібне тіло в 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 зміненням освітленням свідчать, що існує принципова можливість стимуляції мелатонінотворюючої функції шишкоподібного тіла шляхом збільшення довжини темного 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 обґрунтування вибору об'єкту 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.

Висновки

1. Клітинні та гуморальні складові системи неспецифічної імунологічної адаптації організму

мають чіткі циркадіанні та сезонні коливання, які відрізняються за віком.

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

3. Циркадіанна архітектоніка імуноструктурного гомеостазу має пряму залежність від довжини фотоперіоду: за умов подовженої темряви спостерігається активація системи неспецифічного імунного захисту, а при постійному освітленні – відбувається пригнічення.

4. Існує можливість часткової корекції показників системи неспецифічної імунологічної адаптації під час розвитку процесів старіння організму шляхом штучної регуляції світлового режиму та шляхом введення екзогенного мелатоніну.

Перспективи подальших досліджень

Подальша перспектива досліджень полягає у розкритті нових механізмів біоритмології.

Література. 1. Комаров Ф.И., Рапопорт С.И. Хронобиология и хрономедицина. – М.: Триалд-Х, 2000. – 488 с. 2. Пішак В.П. Клінічна анатомія шишкоподібного тіла. – Тернопіль: Укрмедкнига, 2000. – 160 с. 3. Пішак В.П. Шишкоподібне тіло і біохімічні основи адаптації. – Чернівці: Медакадемія, 2003. – 152 с. 4. Пішак В.П., Захарчук О.І., Пішак О.В. Шишкоподібне тіло і хроноритми імунної системи. – Чернівці: Прут, 1997. – 270 с. 5. Писарук А.В., Шатило В.Б., Асанов Э.О. Влияние мелатонина на суточные ритмы температуры тела, гемодинамики и вариабельность сердечного ритма у пожилых людей // Пробл. старения и долголетия. – 2003. – Т.12, №1. – С.35–44. 6. Шатило В. Комплексний вплив Віта-мелатоніну на покращання сну та стресову стійкість серцево-судинної системи людей похилого віку // Ліки України. – 2004. – №2. – С.61–62. 7. Arendt J. Melatonin and mammalian pineal gland. – Chapman & Hall, 1995. – 321 p. 8. Kloeden P.E., Rosler R., Rosler 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 immunity // Second Intern. Workshop on NIM. Scientific Programme and Abstracts. – Dubrovnik, 1986. – №13. – P. 6-10. 10. Milin J., Demajo M., Milin R. Pineal gland buffers initial stress-induced ACTH burst // Acta boil. Yugosl. – 1998. – Vol.24, №2. – P. 171-176. 11. Reiter R.J. et al. A review of the evidence supporting melatonin's role as an antioxidant // J. Pineal. Res. – 1995. – Vol.18. – P. 2-11. 12. Srinivasan V. The Pineal gland: Its physiological and pharmacological role //

Indian. J. Physiol. And Pharmacol. – 1989. – Vol.33, №4. – P.263–272. 13. Touitou Y. Human aging and melatonin. Clinical relevance // Gerontol. – 2001. – V.36, №7. – P.1083 – 1100. 14. Waldhauser F., Kovacs J., Reiter R. Age-related changes in melatonin levels in human and it's potential consequences for sleep disorders // Exp. Gerontol. – 1998. – Vol.33, №7-8. – P.759–772. 15. Wetterberg L., Bergiannaki J.D., Paparrigopoulos T. et al. Normative melatonin excretion: a multinational study // Psychoneuroendocrinology. – 1999. – Vol.24, №2. – P. 209-226. 16. Zhao Z.Y., Xie Y., Fu Y.R., et al. Aging and the circadian rhythm of melatonin: a cross-sectional study of Chinese subjects 30-110 yr of age // Chronobiol. Int. – 2002. – V.19, №6. – P. 1171-1182.

ВЛИЯНИЕ ШИШКОВИДНОГО ТЕЛА НА БИОРИТМОЛОГИЧЕСКИЙ ПРОФИЛЬ ПОКАЗАТЕЛЕЙ НЕСПЕЦИФИЧНОГО ИММУНИТЕТА ПРИ СТАРЕНИИ ОРГАНИЗМА

А. И. Захарчук, Ю. М. Вепрюк, М. И. Грицюк

Резюме. Приведенные результаты биоритмологического профиля показателей неспецифической иммунологической адаптации организма после удаления шишковидного тела у старых крыс. За показателями полученных результатов высказано предположение о прямом влиянии шишковидного тела на циркадианные и сезонные ритмы показателей неспецифического иммунитета у млекопитающих. Экспериментальное введение экзогенного мелатонина привело к нарушениям архитектуры хроноритмов, которые были изменены вследствие хода процессов старения.

Ключевые слова: адаптация, шишковидное тело, старение, хроноритмы, эпифизэктомия, неспецифический иммунитет, мелатонин, млекопитающие.

THE INFLUENCE OF PINEAL GLAND ON THE BIORHYTHMOLOGICAL PROFILE OF NON-SPECIFIC IMMUNOLOGICAL ADAPTATION PARAMETERS DURING THE ORGANISM AGING

O. I. Zakharchuk, Y. M. Vepriuk, M. I. Grytsiuk

Abstract. It was studied the influence of epifisectomy on the biological profile of non-specific immunological adaptation parameters during the organism aging. The received results give an opportunity to make the decision about direct influence of the pineal gland on the circadian and seasonal rhythms of the non-specific immunodefence parameters of mammals. It was made an attempt to eliminate the chronorhythm architectonics with the help of exogene melatonin, which are especially expressed under the organism aging.

Key words: adaptation, epifisectomy, chronorhythm, pineal gland, non-specific immunodefence, melatonin, aging, mammals.

Bukovinian State Medical Academy (Chernivtsi)

Clin. and experim. pathol. – 2004. – Vol.3, №1. – P.31–35.

Надійшла до редакції 17.01.2004