

**І.Ф. Лабунець**

## **Біологічно активні чинники тимуса та мелатонінутворювальна функція епіфіза у мишей при старінні**

*Исследованы возрастные особенности действия биологически активных факторов тимуса на функцию эпифиза у мышей линии СВА. Установлено, что у взрослых мышей (3–4 мес) концентрация мелатонина в сыворотке крови существенно увеличивается через 3 ч после одной инъекции тималина. Активирующее влияние последнего на функцию эпифиза зависит от сезона года и в значительной степени связано с повышением содержания одного из гормонов тимуса – тимического сывороточного фактора (ТСФ). Супернатант стромы тимусов взрослых мышей, в котором содержание ТСФ было высоким, усиливал *in vitro* мелатонин-образующую функцию эпифиза. У старых мышей (23–24 мес) не обнаружено активирующего влияния факторов тимуса *in vivo* и *in vitro* на функцию эпифиза, а также сезонной реакции эпифиза на их введение. Обсуждается значение влияния тимических факторов на концентрацию мелатонина для ритмичности функционирования иммунной системы.*

### **ВСТУП**

В імунно-нейроендокринних взаємодіях особливе значення мають зв'язки, які реалізуються на рівні центральних органів цих систем, а саме тимуса та епіфіза [6, 18, 24]. Встановлено, що видалення епіфіза у дорослих тварин призводить до зменшення маси та клітинності тимуса, порушення структури його епітеліального компонента, що супроводжується зміною інтенсивності клітинних і гуморальних імунних реакцій [17, 19, 24]. Ми показали, що у мишей із фармакологічною блокадою функції епіфіза істотно зменшується вміст у крові одного із гормонів тимуса – тимічного сироваткового фактора (ТСФ), який впливає на диференціювання Т-лімфоцитів та їх функціональні властивості, взаємодіє із нейроендокринною системою [3, 6]. Разом з тим після введення мелатоніну, а також у тварин із посиленою мелатонінутворювальною функцією епіфіза вміст ТСФ у крові та інтенсивність

імунних реакцій істотно підвищуються [5, 6, 19]. У дорослих тварин із видаленням тимусом стимулювальний вплив епіфізарних чинників на імунну систему слабшає [6]. У таких тварин зміни значень показників імунної та ендокринної систем [10] свідчать про можливість існування зворотного впливу тимуса на мелатонінутворювальну функцію епіфіза оскільки мелатонін є регулятором біоритмів цих систем [9, 12, 19, 22]. Значний інтерес викликає дослідження впливу чинників тимуса на епіфіз при старінні. Це пояснюється тим, що вікові порушення ритму ендокринної функції тимуса, зокрема ТСФ, передумовлюють вікові зміни ритмічності функцій імунної та ендокринної систем, а введення старим мишам тимічних чинників призводить до поліпшення деяких із них [9, 10].

Мета нашої роботи – дослідити вікові особливості впливу біологічно активних чинників тимуса на мелатонінутворювальну функцію епіфіза у мишей.

© І.Ф. Лабунець

## МЕТОДИКА

Досліди проведено на дорослих (3–4 міс) і старих (23–24 міс) мишах лінії СВА (розплідник Інституту геронтології АМН України).

У I серії досліджень вивчали вплив біологічно активних чинників тимуса *in vivo* на мелатонінутворювальну функцію епіфіза мишей різного віку. Оцінювали дію тимічних чинників на зміни функції залози та її коливання залежно від сезону. Із тимічних чинників використовували тималін, оскільки він впливає на структуру епітеліального компонента тимуса у тварин [14] і, за нашими даними, підвищує вміст ТСФ у крові мишей [10]. Препарат вводили дорослим (n=14) і старим (n=11) мишам один раз, підшкірно, у дозі 5 мг/100 г. Дослідження проводили через 20 хв і 3 год після ін'єкції тималіну восени. При вивченні особливостей впливу тималіну на функцію епіфіза залежно від сезону року препарат вводили дорослим (n=10) і старим (n=11) мишам один раз, підшкірно, весною та восени, у дозі 5 мг/100 г. Дослідження здійснювали через 24 год після ін'єкції.

Контрольні групи дорослих (n=21) і старих (n=21) мишей отримали відповідну кількість ін'єкцій 0,9%-го розчину хлориду натрію.

У день дослідження мишей згаданих вище груп уранці декапітували під ефірним наркозом. Сироватку крові зберігали при –20°C упродовж 2 міс і використовували для визначення вмісту мелатоніну.

У II серії експериментів оцінювали вікові особливості впливу тимічних чинників *in vitro* на мелатонінутворювальну функцію епіфіза мишей. З цією метою використовували супернатант тригодинних культур стромы тимусів дорослих інтактних мишей. Для отримання тимічного супернатанта з тимуса останніх (n=5) вилучали клітини, а стромальну тканину, яка залишилась, інкубували в середовищі 199 у об'ємі  $1 \cdot 10^{-3}$  л при 37°C упродовж 3 год [5]. Надалі у інтактних дорослих (n=16) і старих (n=16) мишей вилучали епіфізи. Епіфізи конт-

рольних дорослих і старих тварин інкубували в  $1,5 \cdot 10^{-4}$  л середовища 199 при 37°C упродовж 3 год в атмосфері, яка складалась із 95 %  $O_2$  і 5 %  $CO_2$  [23]. Епіфізи дослідних дорослих і старих мишей інкубували в тих самих умовах, але за наявності  $1,0 \cdot 10^{-4}$  л тимічного супернатанта. Після інкубації культуральне середовище епіфізів усіх груп тварин екстрагували  $5 \cdot 10^{-4}$  л дихлорметану і екстракт випарювали в струмені азоту при кімнатній температурі. Після випарювання осад розчиняли в  $2,0 \cdot 10^{-4}$  л бідистильованої води і надалі використовували для визначення концентрації мелатоніну.

Концентрацію мелатоніну у сироватці крові та культуральному середовищі епіфізів оцінювали радіоімунним методом за допомогою тест-набору “Melatonin-RIA” фірми “Biosource” (Бельгія).

Для вивчення впливу тималіну на функцію епіфіза було визначено вміст ТСФ у сироватці крові мишей I серії. Крім того, вміст цього гормону визначали у тимічному супернатанті, який використовували в II серії експериментів. Супернатант, як і сироватку, пропускали через ультрафільтр CF-25 (“Amicon”, США). Фільтрати послідовно розводили та використовували для визначення вмісту гормону за методом, який оснований на відновленні чутливості спонтанних розеткоутворювальних клітин селезінки мишей із вилученим тимусом до азотіоприну [15]. Результати наводили у  $\log_2$  титру гормону. Надалі фільтрований тимічний супернатант із відомим вмістом ТСФ використовували в дослідах *in vitro*.

Цифрові результати обробляли статистично за допомогою критерію t Стьюдента [11].

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

*Вплив біологічно активного чинника тимуса in vivo на мелатонінутворювальну функцію епіфіза у мишей різного віку.* Результати дослідження динаміки мелатонінутворювальної функції епіфіза у мишей різного віку після однієї ін'єкції тималіну наведено в

**Таблиця 1. Концентрація мелатоніну (пмоль/л) у крові дорослих і старих мишей у різні строки після однієї ін'єкції 0,9%-го розчину хлориду натрію та тималіну**

Група тварин	Строки дослідження	
	20 хв	3 год
Дорослі миші		
Контроль	403,71±164,3 (5)	51,8±13,6** (6)
Дослід	280,8±109,2 (7)	236,5±78,1* (7)
Старі миші		
Контроль	233,1±123,4 (5)	97,2±6,0 (6)
Дослід	74,0±24,7 (5)	113,1±36,9 (6)

Примітка. У дужках – кількість мишей. \*P<0,05 порівняно з контролем;  
\*\*P<0,05 порівняно зі значеннями через 20 хв.

табл. 1. У дорослих мишей концентрація мелатоніну істотно збільшилося через 3 год після введення препарату, а у старих мишей вона не відрізнялася від значень контрольної групи. В більш ранні строки цей показник мав тенденцію до зменшення незалежно від віку тварин.

Отже, у дорослих мишей мелатонінотворювальна функція епіфіза фазово змінюється у відповідь на введення біологічно активного чинника тимуса. У старих мишей подібний характер реакції з боку залози відсутній.

Результати дослідження впливу тималіну на мелатонінотворювальну функцію епіфізу у дорослих і старих мишей залежно від сезону року наведено в табл. 2. Восени, через 24 год після однієї ін'єкції тималіну концентрація мелатоніну в крові істотно зменшилась у дорослих мишей і мала тенденцію до зменшення у старих тварин. Весною концентрація мелатоніну більш

виразно підвищувалася у дорослих мишей.

Таким чином, у дорослих мишей зміни мелатонінотворювальної функції епіфіза після введення тималіну залежали від сезону року. У старих мишей подібна залежність зникала.

*Вплив біологічно активного чинника тимуса in vitro на мелатонінотворювальну функцію епіфіза у мишей різного віку.* В цій серії дослідів використовували тимічний супернатант, в якому вміст ТСФ був високим ( $\log_2$  титру відповідав 8). Результати дослідження впливу тимічного супернатанта на концентрацію мелатоніну в культуральному середовищі епіфізів дорослих і старих мишей наведено в табл.3. Встановлено, що у культуральному середовищі епіфізів дорослих мишей вміст мелатоніну істотно збільшувався після інкубації із тимічним супернатантом; у старих мишей значення показника не відрізнялися від контрольних.

**Таблиця 2. Вплив однієї ін'єкції 0,9%-го розчину хлориду натрію та тималіну на концентрацію мелатоніну (пмоль/л) в крові дорослих і старих мишей залежно від сезону року**

Група тварин	Весна	Осінь
Дорослі миші		
Контроль	396,03±160,82 (4)	427,42±126,42 (6)
Дослід	690,15±291,5** (4)	119,11±6,88* (6)
Старі миші		
Контроль	100,19±7,31** (4)	466,12±83,85 (6)
Дослід	207,26±69,7 (5)	303,15±55,9*** (6)

Примітка. У дужках – кількість мишей. \*P<0,05 порівняно з контролем;  
\*\*P<0,05 порівняно зі значеннями в осінній період року;  
\*\*\*P<0,05 порівняно з дорослими мишами.

Отже, у дорослих мишей, на відміну від старих, існує можливість безпосереднього впливу біологічно активного чинника тимуса на мелатонінотворювальну функцію епіфіза.

Таким чином, за нашими результатами, у дорослих мишей після введення тималіну мелатонінотворювальна функція епіфіза посилюється. Таку реакцію з боку залози ми спостерігали через 3 год, тоді як у більш ранні строки дослідження (20 хв) концентрація мелатоніну в крові мишей навіть дещо зменшилася, що спостерігалось і через 24 год після ін'єкції тималіну восени (див. табл. 2). Фазність змін мелатонінотворювальної функції епіфіза властива дорослим тваринам і у разі дії на організм стресових чинників різної природи (гіпотермія, опромінення, гіпокінезія, імунізація) [2, 7]. Незважаючи на те, що при дії тималіну і Т-залежного антигена строки активації функції епіфіза були різними (3 год і 15–20 хв відповідно), в цих умовах одночасно істотно збільшувався вміст ТСФ [8]. У нашому дослідженні було встановлено, що через 3 год після введення тималіну титр ТСФ значно перевищив показник контрольної групи тварин і був  $9,7 \pm 0,7$  ( $n = 6$ ) і  $4,3 \pm 0,2$  ( $n=6$ ) відповідно ( $P < 0,05$ ). Слід зазначити, що зменшення концентрації мелатоніну через 24 год після введення тималіну корелювало зі зменшенням титру ТСФ (до  $8,0 \pm 0,5$ ,  $n=6$ ,  $P < 0,05$ ). Результати досліджень *in vivo* та безпосереднього активуючого впливу тимічного супернатанту на мелатонінотворювальну функцію епіфіза (через 3 год інкубації) свідчать про те, що тимічні чинники, зокрема ТСФ, беруть участь у реалізації зворотного впливу тимуса на функціонування епіфіза. Ця дія, можливо,

здійснюється через систему циклічних нуклеотидів пінеалоцитів [22].

Зміни функції епіфіза під впливом біологічно активних чинників тимуса можуть мати значення при циркадіанних взаємодіях функцій цих залоз, а також адаптивних змінах імунної системи під дією антигенних стимулів у різні сезони року. Так, нами встановлена однотипність фазових змін вмісту ТСФ і мелатоніну та наявність кореляційного зв'язку між коливаннями цих гормонів упродовж доби у молодих здорових людей [9].

У дорослих мишей після імунізації Т-залежним антигеном титр ТСФ істотно збільшується вже через 15 хв [8]. Тимічні гормони, разом з іншими біологічно активними чинниками активованих клітин імунної системи, відіграють роль аферентного сигналу для гіпоталамо-гіпофізарно-наднирковозалозної системи, який значно посилює її активність [4, 16]. Установлено, що введення одного з гормонів тимуса у третій шлуночок мозку дорослих мишей призводить до різкого підвищення вмісту глюкокортикоїдів у крові [20]. Зміни останніх в індуктивну фазу імунної відповіді сприяють зниженню функції високочутливих до їх дії Т-супресорів [4, 16]. Причому у імунізованих мишей в ранні строки після антигенного стимулу активація функції тимуса та кори надниркових залоз залежить від сезону року і більш виражена восени порівняно з весною [8, 10]. Крім того, показано, що вміст Т-супресорів у селезінці восени значно менший, ніж весною, тоді як сила імунної відповіді, навпаки, вища [10, 21]. Як нами встановлено, у дорослих мишей мелатонінотворювальна функція

**Таблиця 3. Концентрація мелатоніну (пг/залозу) у культуральному середовищі епіфізів дорослих і старих мишей після їх інкубації *in vitro* із тимічним супернатантом**

Культуральне середовище	Дорослі миші	Старі миші
Середовище 199 (контроль)	$22,4 \pm 3,3$ (8)	$14,3 \pm 0,5^*$ (8)
Середовище 199 і тимічний супернатант	$34,5 \pm 4,8^{**}$ (8)	$14,8 \pm 0,8^*$ (8)

Примітка. У дужках – кількість досліджень; \* $P < 0,05$  порівняно зі значеннями у дорослих тварин; \*\* $P < 0,05$  порівняно з контролем.

епіфіза також по-різному змінюється у відповідь на введення тималіну в окремі сезони року. Якщо восени (через 3 год) концентрація мелатоніну в крові збільшувалося (див. табл.1), то в ці строки весною, за нашими попередніми даними, не відрізнялася від контрольних значень ( $P>0,05$ ).

Оскільки епіфіз включається в розвиток адаптивних реакцій організму, регулюючи функціональний стан гіпоталамо-гіпофізарно-наднирковозалозної системи [1, 2, 12, 22], не виключено, що гормони тимуса можуть реалізувати активуючий вплив на останню і на рівні епіфіза. Дійсно, ми раніше встановили, що зі збільшенням титру ТСФ у крові дорослих імунізованих мишей в індуктивну фазу імунної відповіді одночасно підвищився і вміст мелатоніну; більше того, такі зміни гормонів передумовлювали наступне збільшення концентрації кортикостерону в крові [7,8]. Активація функції епіфіза в ранні строки дослідження змінюється її послабленням через 24 год (див. табл.2). Подібну фазність коливань вмісту мелатоніну ми спостерігали також у імунізованих мишей [7]. Послаблення мелатонінутворювальної функції епіфіза скоріше за все спрямоване на обмеження надмірної активації гіпофізарно-наднирковозалозної системи, зокрема в умовах антигенного навантаження. Можливість існування такого механізму в стресових умовах показана іншими авторами [2].

Не виключено, що за певних умов вплив чинників тимуса на функцію епіфіза може бути пригнічувальним і при цьому опосередкованим корою надниркових залоз. Наприклад, влітку у мишей вміст ТСФ і кортикостерону високий порівняно з іншими сезонами, проте мелатоніну – низький [10, 22]. В епіфізі є рецептори до глюкокортикоїдів, а їх надлишок послаблює функцію епіфіза [1, 22].

Ми не спостерігали посилювальної дії тималіну *in vivo* на мелатонінутворювальну функцію епіфіза старих мишей, хоча через 3 год після його ін'єкції вміст ТСФ був високим –  $6,8 \pm 0,9$  ( $n=6$ ) порівняно з  $3,0 \pm 0,4$

( $n=6$ ) у контролі ( $P<0,05$ ). У старих мишей тимічний супернатант також не вплинув *in vitro* на функцію епіфіза. Отримані результати свідчать про вікові порушення зв'язків між функціонуванням тимуса та епіфіза і підтверджуються монотонністю циркадіанних коливань вмісту ТСФ і мелатоніну при старінні [9]. Зміна чутливості епіфіза до дії тимічних чинників, зокрема ТСФ, може пояснюватися віковими структурними його змінами [22]. Особливості ендокринного балансу при старінні також сприяють формуванню змін сезонної реакції епіфіза на дію тимічних чинників у старих мишей [13]. Так, ми встановили, що у інтактних старих мишей вміст глюкокортикоїдів восени значно перевищує той, що властивий дорослим тваринам [10]. Вікові порушення сезонної реакції епіфіза на регуляторні впливи тимуса можуть бути одним із механізмів порушень циркануального ритму імунної відповіді, оскільки восени у старих тварин концентрація кортикостерону не підвищувалося в ранні строки після імунізації, а вміст Т-супресорів у селезінці залишався високим [8, 10].

Таким чином, отримані нами раніше дані, а також результати цього дослідження підтверджують існування у дорослому організмі реципрокних зв'язків між функціонуванням тимуса і епіфіза, характер яких при старінні змінюється.

## ВИСНОВКИ

1. У дорослих мишей лінії СВА мелатонінутворювальна функція епіфіза змінюється після введення біологічно активних чинників тимуса. Зміни функції залози мають фазовий характер і їх напрямок залежить від сезону року.

2. Тимічні чинники здатні безпосередньо посилювати мелатонінутворювальну функцію епіфіза у дорослих мишей.

3. Активуючий вплив тимічного препарату тималін на вміст мелатоніну в крові дорослих мишей значною мірою пов'язаний

зі збільшенням вмісту ТСФ.

4. У старих мишей змінюється фазність і сезонність реакції епіфіза на дію тимічних чинників, а також механізм впливу останніх на функцію епіфіза.

### I.F.Labunets

#### THYMIC FACTORS AND MELATONIN-PRODUCING PINEAL FUNCTION IN MICE IN AGING

The aging peculiarities of thymic factors influence on pineal gland function in CBA mice were investigated. It was shown that in serum of the adult mice (3-4 m) melatonin level increased significantly in 3 h after one injection of thymic preparation "thymaline". The activating influence of thymaline depended on season and linked with increased level of thymic serum factor (FTS). Thymic stroma supernatant of adult mice with high FTS level increased melatonin-producing pineal function *in vitro*. There was no activating influence of thymic factors on pineal function of old mice (23-24 mo) *in vivo* and *in vitro* as well as the pineal seasonal reaction on the administration of thymaline. The importance of thymic factors influence on melatonin level for the immune system rhythmic functioning was discussed.

*Institute of Gerontology, AMS of Ukraine, Kyiv, Ukraine*

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Бондаренко Л.А. Современные представления о физиологии эпифиза // *Нейрофизиология*. – 1997. – 29, № 3. – С. 212–233.
- 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, № 2. – С. 1643–1649.
- Иммунобиология гормонов тимуса / Под ред. Ю.А.Гриневича, В.Ф.Чеботарева. – К.: Здоров'я, 1989. – 152 с.
- Корнева Е.А., Шхинек Э.К. Гормоны и иммунная система. – Л.: Наука, 1988. – 351 с.
- Лабунец И.Ф., Бутенко Г.М. Влияние биологически активных факторов эпифиза на функциональное состояние тимуса и иммунной системы у стареющих животных // *Пробл. старения и долголетия*. – 1992. – 2, № 3. – С. 280–285.
- Лабунец И.Ф., Бутенко Г.М. Вплив змін функції епіфіза на стан центральної та периферичної ланок імунної системи у мишей // *Физиол. журн.* – 1993. – 39, № 5–6. – С. 40–46.
- Лабунец И.Ф. Вікові зміни мелатонінутворювальної функції епіфіза у імунізованих Т-залежним антигеном мишей лінії СВА // *Там само*. – 2005. – 51, № 4. – С. 45–50.
- Лабунец И.Ф. Вікові особливості функції тимуса та кори надниркових залоз у імунізованих Т-залежним антигеном мишей лінії СВА // *Там само*. – № 1. – С. 77–83.
- Лабунец И.Ф. Влияние мелатонина на биоритмы функционального состояния тимуса, иммунной системы и коры надпочечников у пожилых людей // *Пробл. старения и долголетия*. – 2005. – 14, № 4. – С. 313–322.
- Лабунец И.Ф., Драгунова В.О., Магдич Л.В., Копилова Г.В. Вплив модуляції функції тимуса на циркануальний ритм функціонального стану кісткового мозку у мишей лінії СВА // *Там само*. – № 1. – С. 27–33.
- Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Высш. школа, 1973. – 343 с.
- Малиновская Н.К. Роль мелатонина в организме человека // *Клин. медицина*. – 1998. – 76, № 10. – С. 15–22.
- Старение мозга / Под общ. ред. В.В.Фролькиса. – Л.: Наука, 1991. – 277 с.
- Хавинсон В.Х., Морозов В.Г. Пептиды эпифиза и тимуса в регуляции старения. – СПб.: ИКФ "Фоллиант", 2001. – 160 с.
- 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.
- Besedovsky H.J., del Rey A. Immunoneuroendocrine interactions: facts and hypotheses // *Endocr. Rev.* – 1996. – 17, № 1. – P. 64–102.
- Fabris N., Vocchegiani E., Provinciali M. Plasticity of neuroendocrine-thymus interaction during aging // *Exp. Gerontol.* – 1997. – 32, № 4–5. – P. 415–429.
- Goya R.G., Bolognani F. Homeostasis, thymic hormones and aging // *Gerontology*. – 1999. – 45, № 3. – P. 174–178.
- Guerrero J.M., Reiter R.J. Melatonin-immune system relationships // *Current Top. Med. Chem.* – 2002. – 2, № 2. – P. 167–179.
- Millington G., Buckingham J.C. Thymic peptides and neuroendocrine-immune communication // *J. Endocrinol.* – 1992. – 133, № 2. – P. 163–169.
- Prendergast B.J., Nelson R.J., Zucker I. Mammalian seasonal rhythms: behavior and neuroendocrine substrates // *Hormone, brain and behavior*. – 2002. – 2. – P. 93–156.
- Reiter R.J. Experimental observations related to the utility of melatonin in attenuating age-related diseases // *Adv. Gerontol. (St.-Peterburg)*. – 1999. – № 3. – P. 121–132.
- Richardson B.A., Yaga K., Reiter R.J., Morton D.L. Pulsed static magnetic field effects on in-vitro pineal indolamine metabolism // *Biochem. and Biophys. Acta.* – 1997. – 1137. – P. 59–64.
- Savino W., Dardenne M. Neuroendocrine control of thymus physiology // *Endocrinol. Rev.* – 2000. – 21, № 4. – P. 412–443.

*Ин-т геронтології АМН України, Київ*

*Матеріал надійшов до редакції 19.05.2006*