

Российская академия медицинских наук
Сибирское отделение
ГУ Научно-исследовательский институт клинической иммунологии

**ИММУНОЛОГИЯ,
ИММУНОГЕНЕТИКА,
ИММУНОПАТОЛОГИЯ**

*Материалы 6-й отчетной конференции
ГУ НИИКИ СО РАМН*

Под редакцией:

Замдиректора ГУ НИИКИ СО РАМН по научной работе
члена-корреспондента РАМН, профессора В. И. Коненкова

*Scientific report 2003
Institute of Clinical Immunology
Siberian Branch of Russian Academy of Medical Sciences*

Новосибирск
2003

**ВЗАИМООТНОШЕНИЯ СУТОЧНЫХ ВАРИАЦИЙ
СОДЕРЖАНИЯ МЕЛАТОНИНА В СЛЮНЕ
И ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ КЛЕТОК
В КРОВИ У ЗДОРОВЫХ ЛЮДЕЙ**

*Шурлыгина А. В., Литвиненко Г. И., Малышева О. А., Кудаева О. Т.,
Ширинский В. С., Козлов В. А., Труфакин В. А.*

Все возрастающий интерес к гормону эпифиза мелатонину обусловлен широким спектром его биологической активности. Мелатонин участвует в регуляции функций центральной и вегетативной нервной систем, эндокринных органов, иммунной системы и их суточной ритмической активности. Иммуномодулирующее действие мелатонина обусловлено рецепцией мелатонина некоторыми субпопуляциями лимфоидных клеток, а также опосредовано влиянием опиоидов, тимических гормонов, ряда цитокинов и др. (Maestroni G. J. M., Conti A., 1996).

Однако, работы, посвященные выяснению эффектов и механизмов иммуноактивного действия мелатонина, демонстрируют противоречивые результаты. Эффект мелатонина может зависеть от степени активации клеток перед его применением, а также от того, каким способом были активированы клетки, от дозы гормона и времени суток, в которое он применяется (Garcia-Maurino S. e. a., 1997). Еще меньше ясности во взаимоотношениях эндогенного мелатонина с иммунными показателями. Большинство исследователей сообщают об иммуномодулирующей и онкостатической роли эндогенного мелатонина, но в некоторых работах, касающихся онкологических заболеваний крови, приводятся данные о том, что пинеалэктомия увеличивает выживаемость мышей-опухоленосителей, а введение мелатонина приводит к прогрессированию лейкемии у животных с удаленным эпифизом (Conti A. e. a., 1992).

Известно, что продукция мелатонина имеет четкий суточный ритм со значительным перепадом уровня гормона в точках минимума и максимума. Показано также, что суточный ритм свойственен и субпопуляционному составу пула иммунокомпетентных клеток, состоянию их рецепторного аппарата и метаболического потенциала (Труфакин В. А. и др., 1995; Шурлыгина А. В. и др., 1999). Таким образом, на протяжении суток меняется как количество и активность иммунокомпетентных клеток, так и уровень мелатонина. Однако неясно, в каких соотношениях находятся суточные колебания этих параметров и связаны ли они друг с другом.

Актуальность проблемы определяется не только неполнотой наших знаний о нейроэндокринной регуляции циркадианной организации иммунной системы, но и необходимостью отработки рациональных схем иммуномодуляции с применением мелатонина или его индукторов.

В задачу настоящего исследования входило изучение суточных вариаций концентрации мелатонина в слюне здоровых людей в ассоциации с оценкой содержания и функциональных свойств иммунокомпетентных клеток периферической крови.

Работа проводилась на здоровых мужчинах и женщинах в возрасте 22-25 лет, студентах Новосибирской государственной медицинской академии. Всего было обследовано 16 человек в период с февраля по май 2000 года. Кровь для определения параметров иммунного статуса и слюну для определения мелатонина забирали утром в 9.00 ч и вечером в 21.00 ч. В крови определяли субпопуляции CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD16⁺, CD20⁺, CD25⁺, HLA-DR⁺, а также фагоцитарную активность моноцитов и гранулоцитов методом проточной цитометрии с моноклональными антителами и мечеными частицами латекса. Активность сук-

цинатдегидрогеназы (СДГ), лактатдегидрогеназы (ЛДГ) и НАДФ-диафоразы (НАДФ-Д) в лимфоцитах крови выявляли цитохимическим методом с применением п-нитротетразолия фиолетового по Р. П. Нарцисову (1969). Уровень мелатонина в слюне определяли иммуноферментным методом с применением набора Melatonin-ELISA-Kit (ICN-Biomedicals, Inc.) согласно протоколу фирмы-изготовителя.

У большинства обследованных были обнаружены суточные вариации уровня мелатонина в слюне с более высокой концентрацией вечером и более низкой утром («нормальные вариации»), а также довольно значительные индивидуальные различия. Оказалось возможным выделить группы с высоким, средним и низким уровнем утреннего или вечернего мелатонина. Кроме того, обнаружены индивидуальные особенности характера суточных вариаций мелатонина: у части обследованных утренняя концентрация гормона была выше вечерней («инверсия»), а у части отсутствовала разница между утренней и вечерней концентрацией гормона («0-вариации»). Характер суточных колебаний мелатонина оказался связанным с сезоном, во время которого проводилось обследование: большинство «0-вариаций» и все «инвертированные вариации» приходились на вторую половину апреля и май.

В группе с высоким уровнем вечернего мелатонина обнаружены сниженные среднесуточные значения фагоцитарной активности гранулоцитов, процента HLA-DR⁺ моноцитов и процента CD16⁺ лимфоцитов, но было повышено отношение CD4/CD8 (по сравнению с группами со средним и низким уровнем вечернего же мелатонина). В группе с высоким уровнем утреннего мелатонина были повышены среднесуточные значения процента HLA-DR⁺ моноцитов, процента CD16⁺ лимфоцитов и отношения CD4/CD8, но снижены среднесуточные уровни процента CD3⁺, CD8⁺ клеток и активности ЛДГ в лимфоцитах крови (по сравнению с низким уровнем утреннего мелатонина).

Более высокие показатели иммунной системы, которые регистрируются у людей с повышенным утренним содержанием мелатонина, укладываются в представления об иммуностимулирующем действии гормона. Высокий вечерний уровень содержания мелатонина, наоборот, связан со снижением некоторых показателей иммунитета – фагоцитарной активности гранулоцитов и моноцитов, а также количества НК-клеток в периферической крови. В некоторое противоречие с полученными нами данными приходит тот факт, что экзогенный мелатонин обладает иммунопотенцирующим действием только при назначении в вечерние часы (Малышева О. А., Ширинский В. С., 1998). Однако, воз-

можно, что эффекты экзогенного и эндогенного мелатонина не идентичны. Кроме того, в данном случае может проявляться действие отрицательной обратной связи между цитокинами и мелатонином (Withyachumpankul B. e. a., 1991). Вполне вероятно, что характер и выраженность обратных связей между иммунной и нейроэндокринной системами подчиняется суточному ритму.

Корреляционный анализ показал различия во взаимоотношениях мелатонина и иммунологических показателей в зависимости от характера суточных вариаций гормона, а, следовательно, и от сезона года. У лиц с «нормальными вариациями» мелатонина обнаружены сильные корреляционные связи некоторых иммунологических параметров с утренней или вечерней концентрацией гормона в слюне. У лиц с «инвертированными» или «0» вариациями мелатонина корреляционные связи между указанными параметрами отсутствовали. Таким образом, сезонные сдвиги иммунологической реактивности могут в определенной мере объясняться сезонной динамикой продукции мелатонина.

Результаты исследования подтверждают данные о том, что мелатонин является адаптационным гормоном, который участвует в координации и синхронизации содержания и активности иммунокомпетентных клеток в физиологических условиях. В то же время, нарушение продукции и рецепции мелатонина может быть одним из звеньев патогенеза большого круга заболеваний, сопровождающихся иммунными нарушениями (Penev P., Zee P. C., 1997). Поскольку выраженность и характер взаимосвязей между иммунной системой и эпифизом, по-видимому, зависят от фаз суточного и годового циклов, это должно учитываться при оценке иммуноэндокринного статуса и разработке схем применения мелатонина и его индукторов в целях иммунокоррекции.

MUTUAL RELATION OF DAILY VARIATIONS OF THE MELATONIN CONTENTS IN A SALIVA AND OF IMMUNOCOMPETENT CELLS IN BLOOD AT THE HEALTHY PEOPLE

*Shurlygina A. V., Litvinenko G. I., Malysheva O. A., Kudaeva O. T.,
Shirinsky V. S., Kozlov V. A., Trufakin V. A.*

The growing interest to melatonin is caused by a wide spectrum of its biological activity. Melatonin participates in regulation of functions of neuroendocrine and immune systems and their daily rhythmic activity. The immunoenhancing action of melatonin seems to be mediated by T-helper

cell-derived opioid peptides as well as by lymphokines and, perhaps, by pituitary hormones. Melatonin-induced-immuno-opioids (MIIO) and lymphokines imply the presence of specific binding sites or melatonin receptors on cells of the immune system (Maestroni G. J. M., Conti A. 1996). However, the works devoted to research of effects and mechanisms of immunoactive action of melatonin, demonstrate inconsistent results. The effect of the melatonin can depend on a degree of activation of cells before its application, on the method of cell activation, on a doze of hormone and the time, at which it was applied (Garcia-Maurino S. e. a., 1997). It is even less than clearness in mutual relation of endogenous melatonin with immune parameters. The majority of the researchers inform about immunomodulatory and anti-cancer effects of endogenous melatonin, but in some works concerning oncology diseases of blood, there are data that pinealectomy increases survival of tumor-bearing mice, and the introduction of melatonin results in progress of leucemia in animals with removed epiphysis (Conti A. e. a., 1992).

It is known that production of the melatonin has a precise circadian rhythm with significant difference of a level of hormone in points of a minimum and maximum. It is also shown also, that the circadian rhythm is peculiar subpopulation of cells of the immune system, condition of their receptors and metabolism (Trufakin V. A. e. a., 1995; Shurlygina A. V. e. a., 1999). Thus, during a day quantity, activity of cells of the immune system, and the level of melatonin vary. However it is not clear, in what ratio the daily fluctuations of these parameters are and whether they are connected with each other.

The urgency of a problem is defined not only by incompleteness of our knowledge about neuroendocrine regulation of circadian organization of the immune system, but also by necessity of improvement of the rational circuits of the immunocorrection with application of the melatonin or its inductors.

The aim of the present research was to study daily variations of concentration of the melatonin in a saliva of the healthy people in association with an estimation of the contents and functional properties of cells of the immune system of blood.

The work was carried out on the healthy men and women at the age of 22-25 (students of Novosibirsk State Medical Academy). 16 donors (from February to May, 2000) were surveyed. Blood for definition of parameters of the immune status and saliva for definition of the melatonin were taken at 9.00 a. m. and at 9.00 p. m. In blood we defined subpopulations CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD16⁺, CD20⁺, CD25⁺, HLA-DR⁺, and also activity of phagocytosis of monocytes and granulocytes by a method flow cytometry. Activity of succinatdehydrogenase (SDH), lactatdehydrogenase (LDH) and NADF-

diaphorase (NADFD) in lymphocytes of blood was revealed by a cytochemical method with application of p-nitrotetrasolium violet (Narcissov R. P., 1969). A level of melatonin in a saliva was determined by a enzyme immunoassay with application of a set Melatonin-ELISA-Kit (ICN-Biomedicals, Inc.) according to the protocol of firm-manufacturer.

The daily variations of a melatonin level in saliva were found out in the majority of surveyed by evening and lower morning («normal variations»), and also rather significant individual distinctions. It appeared possible to allocate groups with a high, average and low level melatonin in the morning or evening. Besides the individual features of character of daily variations of melatonin are found out: in some people the morning concentration of hormones was above evening («inversion»), and some people did not have difference between morning and evening concentration of melatonin («0-variations»). The character of daily fluctuations of the melatonin has appeared connected with a season, during which the inspection was carried out: the majority of «0-variations» and all the «inverted variations» were at the second half of April and May.

In a group with a high level of melatonin in the evening the reduced daily average meanings of phagocytic activity of granulocytes, percent of HLA-DR⁺ monocytes and percent of CD16⁺ lymphocytes are found out, but the attitude CD4/CD8 was increased (in comparison with group with an average and low level melatonin in the evening). In a group with a high level melatonin in the morning the daily average meanings of percent HLA-DR⁺ monocytes, percent of CD16⁺ lymphocytes and attitude of CD4/CD8 were increased, but the daily average levels of percent CD3⁺, CD8⁺ cells and activity of LDH in lymphocytes of blood are reduced (in comparison with a low level melatonin in the morning).

The higher parameters of the immune system, which are registered in the people with the raised contents of melatonin in the morning, are stacked in representations about immunoenhancing action of the hormone. The high evening level of the contents of the melatonin, on the contrary, is connected with a decrease of some parameters of immunity – of phagocytic activity of granulocytes and monocytes, and also quantity of NK-cells in blood. In some contradiction with the data, received by us, there comes that fact, that exogenous melatonin has immunoenhancing action only in the evening (Malysheva O. A., Shirinskiy V. S., 1998). However, it is possible, that the effects of the exogenous and endogenous melatonin are not identical. Besides action of a negative feedback between cytokines and melatonin in this case can be shown (Withyachumnarnkul B. e. a., 1991). It is quite probable, that

the character and force of feedback between by immune and neuroendocrine systems submits to a daily rhythm.

The correlation analysis has shown distinctions in mutual relation of the melatonin and of the immunological parameters depending on character of daily variations of the hormon, and, hence, and on a season of the year. In the persons with «normal variations» of the melatonin there are find out strong correlation connections of some immunological parameters with morning or evening concentration of the hormon in saliva. In the persons with «inverted» or «0» variations of the melatonin correlation connections between the specified parameters were absent. Thus, the season shifts of the immunological reactivity can also be explained by season dynamics of melatonin production.

The results of research confirm the data that melatonin is the hormon with functions of the adaptation, which participates in coordination and synchronization of the contents and activity of cells of the immune system in physiological conditions. At the same time, the infringement of production and reception of the melatonin can be one of parts of the pathogenesis of large circle of diseases accompanied by immune infringements (Penev P., Zee P. C., 1997). As force and character of interrelations between by immune system and pineal gland, apparently, depend on phases of daily and annual cycles, it should be taken into account at estimation of the immuno-neuroendocrine status and development of the circuits of application of the melatonin and its inductors with the purposes of immunocorrection.