

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ БИОЛОГИЯ**ИЗУЧЕНИЕ СУТОЧНЫХ ВАРИАЦИЙ СОДЕРЖАНИЯ
МЕЛАТОНИНА В СЛЮНЕ И ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ
КЛЕТОК В КРОВИ У ЗДОРОВЫХ ЛЮДЕЙ**

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

*НИИ клинической и экспериментальной лимфологии СО РАМН; *НИИ физиологии СО РАМН; **НИИ клинической иммунологии СО РАМН, Новосибирск*

Исследовали концентрацию мелатонина в слюне и показатели иммунного статуса у здоровых молодых людей. Обнаружено, что утренний и вечерний уровни мелатонина находятся в разных соотношениях с некоторыми показателями иммунитета. Сделано предположение, что выраженность и характер связей между иммунной системой и мелатонином зависят от фазы суточного цикла и это должно учитываться при оценке иммуноэндокринного статуса.

Ключевые слова: *иммунный статус, мелатонин, слюна, суточный цикл*

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 может быть антигензависимым и антигеннезависимым, обусловлено рецепцией мелатонина некоторыми субпопуляциями лимфоидных клеток, а также опосредовано влиянием опиоидов, тимических гормонов, ряда цитокинов и др. [8]. Однако данные об эффектах и механизмах иммуноактивного действия мелатонина противоречивы. Так, A.V.Shai *et al.* [11] сообщают, что мелатонин может селективно активировать Th2-зависимый иммунный ответ. В работе же S.Garsia-Maurino *et al.* [7] утверждается прямо противоположное: мелатонин способен активировать человеческие Th1 к продукции интерлейкина-2, а Th2 не отвечают на мелатонин повышением продукции интерлейкина-4. Эф-

фект 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 [7]. Еще меньше ясности во взаимоотношениях эндогенного мелатонина с иммунными показателями. Большинство исследователей сообщают об иммуномодулирующей, онкостатической роли эндогенного мелатонина, но в некоторых работах, касающихся онкологических заболеваний крови, приводятся данные о том, что пиналэктомия увеличивает выживаемость мышей-опухоленосителей, а введение мелатонина приводит к прогрессированию лейкемии у PNX-животных [6].

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 [3,5]. Таким образом, на протяжении суток меняются как содержание 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.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Обследовано 16 здоровых мужчин и женщин в возрасте 22–25 лет (студенты Новосибирской государственной медицинской академии) в период с февраля по май 2000 г. Кровь для определения параметров иммунного статуса и слюну для определения мелатонина забирали в 9.00 и 21.00 ч. Кровь брали из локтевой вены в количестве 20 мл в гепаринизированные стеклянные пробирки, выделяли моноуклеарные клетки на градиенте фиколл-верографина, окрашивали моноклональными антителами против антигенов CD3, CD4, CD8, CD16, CD20, CD25, HLA-DR, мечеными ФИТЦ и фикоэритрином (“Медбио-спектр” и “Сорбент”), и исследовали методом проточной цитометрии на приборе “FACSCalibur” (“Becton Dickinson”). Фагоцитарную активность гранулоцитов и моноцитов оценивали по количеству клеток, фагоцитировавших ФИТЦ-меченые частицы латекса, также методом проточной цитометрии [4].

Из крови также готовили мазки на предметных стеклах, фиксировали в 60% холодном ацетоне и использовали для выявления активности СДГ, лактатдегидрогеназы (ЛДГ) и NADP-диафоразы в лимфоцитах. Активность ферментов определяли количественным спектрохимическим методом с применением п-НСТ по методу [2]. Уровень мелатонина в слюне определяли иммуноферментным методом с применением набора “Melatonin-ELISA-Kit” (“ICN-Biomedicals”) согласно протоколу фирмы-изготовителя.

Достоверность различий между группами оценивали по непараметрическому *U* критерию Манна—Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

У большинства обследованных обнаружены суточные вариации уровня мелатонина в слюне с более высокой концентрацией вечером и более

низкой утром, а также довольно значительные индивидуальные вариации. Всех обследованных оказалось возможным разделить на следующие группы: с высоким (80 мкг/мл), средним (13–21 мкг/мл) и низким уровнем вечернего мелатонина (0–5 мкг/мл), а также со средним (10–20 мкг/мл) и низким уровнем утреннего мелатонина (0–5,5 мкг/мл). Высокой концентрации мелатонина (больше 20 мкг/мл) в утренних пробах слюны не обнаружено.

В группе с высоким вечерним уровнем мелатонина оказались сниженными среднесуточные значения фагоцитарной активности гранулоцитов, процент HLA-DR⁺-моноцитов и процент CD16⁺-лимфоцитов, но было повышено отношение CD4/CD8 по сравнению с группами с низким и средним уровнем мелатонина (таблица). В группе со средним утренним уровнем мелатонина были повышены процент HLA-DR⁺-моноцитов, CD16⁺-лимфоцитов и отношение CD4/CD8, но снижен процент CD3⁺ и CD8⁺ и активность ЛДГ в лимфоцитах крови по сравнению с группой с низким утренним уровнем мелатонина (таблица).

Более высокие показатели иммунной системы, которые регистрируются у людей с повышенным утренним содержанием мелатонина, укладываются в представление о стимулирующем действии гормона на Th1 и продукцию ими провоспалительных цитокинов, а также на макрофаги и продукцию ими интерлейкина-1 [8]. Стимулирующее влияние более высоких концентраций утреннего мелатонина на функциональную активность лимфоцитов, видимо, отражает и снижение в них активности ЛДГ. При этом соотношение окислительно-восстановительных ферментов сдвигается в сторону преобладания ферментов цикла Кребса — СДГ и NADP-диафоразы, т.е. в сторону преобладания аэробных процессов, которые являются более эффективными в энергообеспечении жизнедеятельности клетки.

Высокий вечерний уровень содержания гормона связан со снижением некоторых показателей иммунитета — функциональной активности гранулоцитов и моноцитов, а также количества естественных киллеров в периферической крови. В некотором противоречие с полученными нами данными вступает тот факт, что экзогенный мелатонин обладает иммунопотенцирующим действием только при назначении в вечерние часы [1]. Однако возможно, что эффекты экзо- и эндогенного мелатонина не идентичны. Кроме того, в данном случае может проявляться действие отрицательной обратной связи меж-

Среднесуточные иммунологические показатели и активность дегидрогеназ лимфоцитов крови (число гранул формазана на 1 клетку) у людей с различными вечерним и утренним уровнями мелатонина в слюне

Показатель	Уровень мелатонина, мкг/мл слюны				
	вечерний			утренний	
	0-5	13-21	80	0-5.5	14-20
Субпопуляции лимфоцитов, %					
CD3	65.9	64.25	68.75	67.46	58.83*
CD4	35.65	36.88	38.25	36.85	58.83
CD8	26	22.75	22	26.1	18.5*
CD16	12.7	12	5.75*	9.65	20.33*
CD20	13.6	12	12.25	13.12	12.67*
Иммунорегуляторный индекс (CD4/CD8)	1.43	1.73	1.75*	1.47	1.88*
Количество моноцитов, экспрессирующих HLA-DR, %	86.13	85.13	73.75*	81.45	93.67*
Общее количество клеток, экспрессирующих HLA-DR, %	0.61	0.59	0.69	0.64	0.56
Фагоцитарная функция, % клеток					
моноцитов	58.9	58.875	62.25	59.27	59.5
гранулоцитов	78.05	75.75	71.25*	76.69	76.33
Средняя концентрация мелатонина в слюне, мкг/мл	2.5	13.1	40.5	9.99	9.6
СДГ	13.8±0.3	15.0±1.5	13.1±1.5	14.2±2.1	12.9±2.6
ЛДГ	14.9±0.5	12.4±2.4	16.8±0.05	15.5±2.4	10.9±4.6*
NADP-диафораза	14.1±0.3	13.6±0.8	15.3±0.01	14.3±1.5	12.9±2.1

Примечание. $p < 0.05$: *по сравнению с группами с минимальным и средним вечерним уровнем мелатонина; *по сравнению с группой с минимальным утренним уровнем мелатонина.

ду цитокинами и мелатонином: известно, что как мелатонин повышает продукцию интерферона- γ и интерлейкина-2 иммунокомпетентными клетками, так и интерферон- γ , по механизму обратной связи, способен снижать секрецию мелатонина в эпифизе [12]. Вечером и ночью у человека повышена активность Th1 и продукция ими провоспалительных цитокинов, в частности, интерферона- γ [9]. Возможно, сочетание сниженного вечернего уровня мелатонина с более высокими иммунными показателями обусловлено тем, что увеличение секреции провоспалительных цитокинов тормозит продукцию мелатонина. Вполне вероятно, что характер и выраженность обратных связей между иммунной и нейроэндокринной системами подчиняется суточному ритму. Можно также предполагать, что в суточном цикле эндогенный мелатонин выступает как истинный иммуномодулятор: сдерживает гиперактивацию Т-клеточного и макрофагального звеньев вечером и ночью (на максимуме их суточного ритма) и стимулирует эти показатели утром (на минимуме их суточного ритма).

Результаты исследования подтверждают, 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 [10]. Поскольку выраженность и характер взаимоотношений между иммунной системой и эпифизом зависят от фазы суточного цикла, это должно учитываться при оценке иммуноэндокринного статуса и разработке схем применения мелатонина и его индукторов в целях иммунокоррекции.

ЛИТЕРАТУРА

1. Малышева О.А., Ширинский В.С. // Int. J. Immunorehabilit. 1998. N 9. P. 80-92.
2. Нарциссов Р.П. // Арх. анат. 1969. № 5. С. 55-91.
3. Труфанов В.А., Шурыгина А.В., Дергачева Т.И., Литвиненко Г.И. // Бюл. экпер. биол. 1995. Т. 199, № 2. С. 181-183.

4. Ширинский В.С., Старостина Н.М., Петрова С.М. и др. // Бюл. СО РАМН. 1999. № 3-4. С. 52-55.
5. Шурыгина А.В., Ковшик И.Г., Вербицкая Л.В., Труфакин В.А. // Там же. № 5. С. 129-133.
6. Conti A., Haran-Ghera N., Maestroni G.J.M. // Med. Oncol. Tumor Pharmacother. 1992. N 9. P. 87-92.
7. Garcia-Maurino S., Gonzalez-Haba M.G., Calvo J.R. et al. // J. Immunol. 1997. Vol. 159, N 2. P. 574-581.
8. Maestroni G.J.M., Conti A. // Neuroimmunomodulation. 1996. Vol. 3, N 6. P. 325-332.
9. Palm S., Postler E., Hinrichsen H. et al. // Chronobiol. Int. 1996. Vol. 13, N 6. P. 423-434.
10. Penev P., Zee P.C. // Ann. Neurol. 1997. N 42. P. 545-553.
11. Shaji A.V., Kulkarni S.K., Agrewala J.N. // Clin. Exp. Immunol. 1998. Vol. 111. N 1. P. 181-185.
12. Withyachumnarnkul B., Nonaka K.O., Attia A.M. // Role of melatonin and pineal peptides in neuroimmunomodulation / Eds. F.Fraschini, R.Reiter. L., 1991. P. 79-90.

Получено 07.02.02

