

Г.И.Литвиненко¹, А.В.Шурлыгина¹, О.Б.Грицык², Е.В.Мельникова¹, П.А.Авровов¹,
М.В.Тендитник² и В.А.Труфакин¹

ВЗАИМООТНОШЕНИЯ МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ШИШКОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ И ОРГАНОВ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ У КРЫС ПРИ ЕСТЕСТВЕННОМ СВЕТОВОМ РЕЖИМЕ И КРУГЛОСУТОЧНОМ ОСВЕЩЕНИИ

¹ Лаборатория хронофизиологии (руков. — академик РАН В.А.Труфакин), Научно-исследовательский институт физиологии и фундаментальной медицины СО РАН; ² лаборатория иммуноморфологии (руков. — проф. А.В.Шурлыгина), Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии СО РАН, г.Новосибирск

Цель работы — выявить комплексную реакцию шишковидной железы (ШЖ) и органов иммунной системы у крыс Вистар в ответ на нарушение светового режима в эксперименте. Животных содержали при естественном световом режиме и круглосуточном освещении 14 сут, после чего крыс декапитировали, определяли массу тела, ШЖ, гонад, тимуса, селезенки. Субпопуляционный состав клеток тимуса и селезенки определяли методом проточной цитометрии. Количество липофусцина в ШЖ оценивали по интенсивности аутофлуоресценции замороженных срезов органа в диапазоне длины волн 505–545 нм с помощью конфокального сканирующего лазерного микроскопа LSM 510 META. Корреляционный анализ выявил увеличение количества, изменение знака и направленности связей между показателями, характеризующими состояние ШЖ и иммунной системы. Это свидетельствует о возросшей напряженности межсистемных взаимоотношений и изменении вектора клеточной миграции и дифференцировки иммунокомпетентных клеток.

Ключевые слова: лимфоциты, шишковидная железа, липофусцин, круглосуточное освещение

Известно, что световой режим — один из самых сильных синхронизаторов суточных биологических ритмов у млекопитающих. Его нарушение вызывает состояние десинхроноза — рас-согласования во времени физиологических процессов — и искажение периодической программы. Пусковым механизмом развития десинхроноза и дальнейшей органической патологии является нарушение ритма продукции мелатонина в шишковидной железе (ШЖ), которая обеспечивает сохранность биологических ритмов всего организма, в том числе и иммунной системы [2]. В современных условиях все большее число людей находятся в ситуациях, когда нарушается световой режим, что приводит к рассогласованию суточных биоритмов. Это перелеты через несколько часовых поясов, работа в условиях вахтовой организации труда в Сибири, Приполярных областях и на Крайнем Севере, работа в ночные смены или по «скользящему» графику. Показано, что у людей, подвергающихся действию аномального светового режима, увеличивается риск развития иммунодефицитных состояний, аллергических и онкологических заболеваний [7, 10]. Однако в настоящее время сведения о механиз-

мах нарушений иммунитета при изменении ритма чередования светлого и темного времени суток немногочисленны и противоречивы. В связи с этим возникает необходимость исследования взаимоотношений морфофункциональных показателей ШЖ и иммунной системы в данных условиях.

Цель настоящей работы — выявить комплексную реакцию ШЖ и органов иммунной системы в ответ на нарушение светового режима в эксперименте.

Материал и методы. Работа проведена на самцах крыс линии Вистар в возрасте 4 мес. Одну группу (7 крыс) содержали при естественном световом режиме (ЕО), вторую (7 крыс) — при круглосуточном освещении (КО) в течение 14 сут, после чего крыс взвешивали и декапитировали под эфирным наркозом в утреннее время суток (с 10.00 до 12.00 ч). Для исследования брали кровь (из декапитационной раны), лимфоидные органы (тимус и селезенку), ШЖ. Органы взвешивали и вычисляли их весовые индексы по формуле: A/B , где A — масса органа, мг, B — масса тела, г. Из тимуса и селезенки готовили клеточную суспензию, в камере Горяева подсчитывали количество ядросодержащих клеток в крови и в суспензии из лимфоидных органов. Среди клеток тимуса и селезенки определяли долю и абсолютное количество субпопуляций лимфоцитов $CD3^+$, $CD4^+8^-$, $CD4^+8^+$, $CD4^+25^+$, $CD45RA^+$, $CD11b/c$ с помощью соответствующих монокло-

Сведения об авторах:

Литвиненко Галина Ивановна, Шурлыгина Анна Вениаминовна (e-mail: anna_v_s@mail.ru), Мельникова Евгения Владимировна, Авровов Павел Александрович, Труфакин Валерий Алексеевич, лаборатория хронофизиологии, Научно-исследовательский институт физиологии и фундаментальной медицины СО РАН, 630117, Новосибирск-117, ул. акад. Тимакова, 4;

Грицык Оксана Борисовна, Тендитник Михаил Владимирович, лаборатория иммуноморфологии, Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии СО РАН, 630117, Новосибирск-117, ул. акад. Тимакова, 2

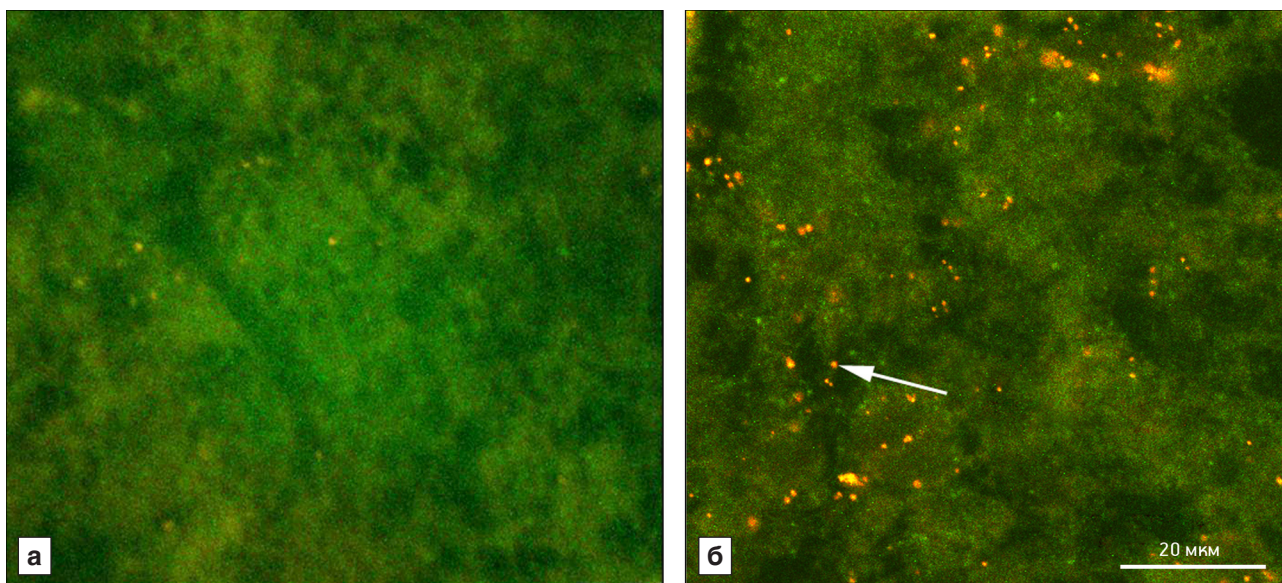


Рис. 1. Гранулы липофусцина (стрелка) в шишковидной железе у крыс, содержащихся при естественном световом режиме (а) и круглосуточном освещении (б).

Аутофлюоресценция в диапазоне частот 560–565 нм

нальных антител, меченных флюоресцеин-изотиоцианатом и фикоэритрином (BD Pharmingen, США), на проточном цитометре FACSCalibur (Becton Dickinson, США). Выделенные ШЖ помещали в среду для замораживания срезов NEG 50 (Thermo Microm Scientific, Германия), после чего замораживали при помощи жидкого азота. Срезы толщиной 10 мкм были приготовлены на микротоме-криостате HM 560 MV (Thermo Microm Scientific, Германия). Липофусцин в ШЖ исследовали, регистрируя и измеряя интенсивность аутофлюоресценции в криостатных срезах с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа LSM 510 Meta (Carl Zeiss, Германия). Для возбуждения аутофлюоресценции применяли аргоновый лазер (длина волны 488 нм), для измерений использовали объектив EC Plan-Neofluar 20x/0.50 M27. Измерение сигнала аутофлюоресценции осуществлялось в 2 канала: зеленый (длина волн от 505 до 545 нм) и красный (длина волн больше 560 нм) [11]. Конфокальная диафрагма для каждого канала была полностью открыта в связи с малой величиной интенсивности аутофлюоресценции. Для получения детальных снимков с большим увеличением использовали объектив Plan-Apochromat 100x/1,40 Oil DIC M27, конфокальная диафрагма для каждого канала была равна примерно 4,3 ед. Эйри.

Все экспериментальные процедуры выполнены с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) и Хельсинской декларации по защите позвоночных животных, используемых для лабораторных и иных целей. Эксперимент был проведен в зимнее время года (февраль 2013 г.).

Для статистической обработки результатов использовали пакет прикладных программ для ПК «Statistica 7». Значимость различий между группами оценивали по критерию Вилкоксона—Манна—Уитни. Проводили также корреляционный анализ с вычислением коэффициентов корреляции Спирмена.

Результаты исследования. Выявлено, что при КО значимо снижаются масса ШЖ ($2,2 \pm 0,4$ мг при ЕО и $0,88 \pm 0,15$ мг при КО, $P < 0,05$), ее весовой индекс ($0,010 \pm 0,002$ при ЕО

и $0,0030 \pm 0,0006$ при КО, $P < 0,05$). В ШЖ наблюдается тенденция к повышению содержания липофусцина (рис. 1) ($39,2 \pm 1,2$ усл.ед. в контроле и 46 ± 4 усл.ед. при КО, $P > 0,05$).

Корреляционный анализ показал, что при ЕО между параметрами органов иммунной системы и ШЖ существует небольшое количество связей (рис. 2, а; таблица). Положительные корреляции определяются между массой ШЖ и ее весовым индексом, а также массой ШЖ и популяциями Т-лимфоцитов селезенки ($CD3^+$, $CD4^+25^+$). Отрицательная связь была выявлена между весовым индексом ШЖ и массой тела. При КО количество корреляционных связей резко возрастает (см. рис. 2, б; таблицу). Положительные связи определяются между показателями ШЖ (количеством липофусцина, массой и весовым индексом ШЖ) и тимуса (масса, доли $CD4^+8^-$ и $CD4^+25^-$ клеток). Отрицательные связи выявлены между количеством липофусцина в ШЖ и количеством популяций Т-лимфоцитов селезенки ($CD4^+8^-$, $CD4^+8^+$), а также между весовыми характеристиками ШЖ (массой и весовым индексом) и относительным содержанием субпопуляций тимоцитов ($CD4^+8^+$ и $CD4^+8^-$).

Корреляционные связи между содержанием клеточных субпопуляций в лимфоидных органах и их весовыми характеристиками при ЕО представлены на рис. 3, а и в таблице. Положительные корреляционные связи обнаружены: между массой тимуса и относительным содержанием в нём $CD4^+8^-$, $CD4^+8^+$ субпопуляций, массой селезенки и относительным содержанием в органе В-лимфоцитов ($CD45RA^+$). Отрицательная связь выявлена между массой тимуса и долей незре-

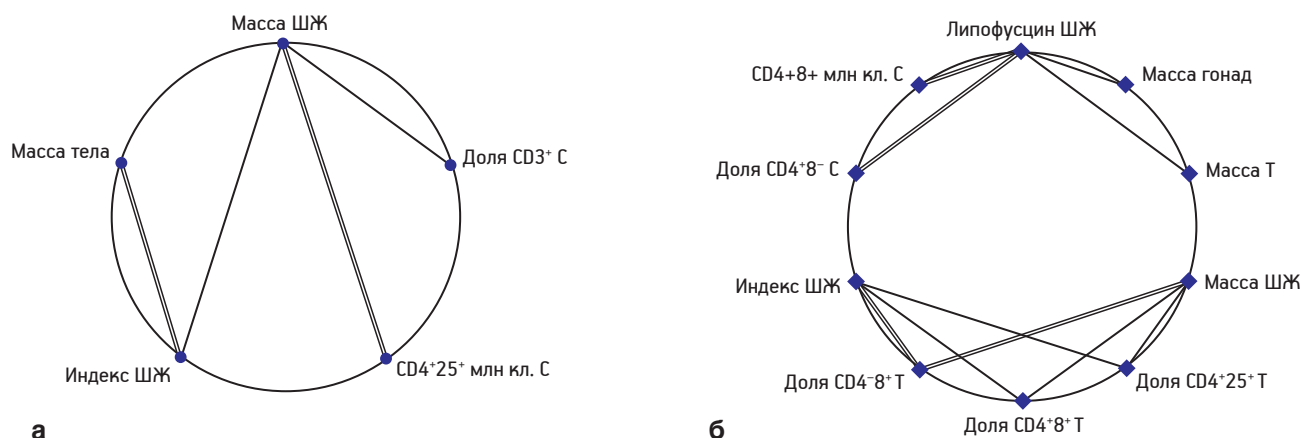


Рис. 2. Корреляционные связи между показателями органов нейроэндокринно-иммунной системы у крыс при естественном световом режиме (а) и круглосуточном освещении (б).

Одинарные линии — положительные, двойные линии — отрицательные связи; Т — тимус; С — селезенка; ШЖ — шишковидная железа. Все коэффициенты корреляции больше 0,7 и значимы при $P < 0,05$

Значения коэффициентов корреляции между морфофункциональными показателями шишковидной железы (ШЖ) и иммунной системы

Естественный световой режим		Круглосуточное освещение	
Пары показателей	r	Пары показателей	r
Масса ШЖ — $CD4^{+}25^{+}$ С	0,815	Л ШЖ — масса Т	0,900
Масса ШЖ — индекс ШЖ	0,889	Масса ШЖ — доля $CD4^{+}8^{+}$ Т	0,900
Масса ШЖ — доля $CD3^{+}$ С	0,778	Масса ШЖ — доля $CD4^{+}25^{+}$ Т	0,900
Индекс ШЖ — масса тела	-0,928	Индекс ШЖ — доля $CD4^{+}25^{+}$ Т	0,900
Масса Т — доля $CD4^{-}8^{+}$ Т	0,828	Л ШЖ — доля $CD4^{+}8^{-}$ С	-0,900
Масса Т — доля $CD4^{+}8^{-}$ Т	0,828	Л ШЖ — АК $CD4^{+}8^{+}$ С	-0,900
Масса С — доля $CD45RA^{+}$ С	0,927	Доля $CD4^{-}8^{+}$ Т — масса ШЖ	-0,900
Масса Т — доля $CD4^{+}8^{+}$ Т	-0,828	Доля $CD4^{-}8^{+}$ Т — индекс ШЖ	-0,900
Доля $CD4^{+}8^{-}$ Т — доля $CD4^{-}8^{+}$ Т	0,885	АК $CD4^{-}8^{+}$ Т — АК $CD3^{+}$ Т	0,900
Доля $CD4^{+}8^{-}$ Т — АК $CD4^{-}8^{+}$ Т	0,885	АК $CD4^{-}8^{+}$ Т — АК $CD4^{+}8^{-}$ Т	0,885
АК $CD4^{+}8^{+}$ Т — АК $CD3^{+}$ Т	0,942	АК $CD4^{-}8^{+}$ Т — АК $CD4^{+}8^{+}$ Т	0,885
Доля $CD4^{+}8^{+}$ Т — доля $CD4^{-}8^{+}$ Т	-0,885	Доля $CD4^{+}8^{+}$ Т — доля $CD4^{+}8^{-}$ Т	-0,900
Доля $CD4^{+}8^{-}$ С — доля $CD4^{+}25^{+}$ С	0,892	Масса С — доля $CD4^{-}8^{+}$ С	0,800
АК $CD4^{+}8^{-}$ С — АК $CD4^{+}25^{+}$ С	0,857	АК $CD3^{+}$ С — АК $CD45RA^{+}$ С	0,892
АК $CD45RA^{+}$ С — АК $CD3^{+}$ С	0,785	АК $CD3^{+}$ С — АК $CD4^{+}8^{-}$ С	0,964
АК $CD45RA^{+}$ С — АК $CD4^{+}8^{-}$ С	0,785	АК $CD3^{+}$ С — АК $CD4^{-}8^{+}$ С	0,964
АК $CD11b/c^{+}$ С — АК $CD3^{+}$ С	0,857	АК $CD3^{+}$ С — доля $CD4^{-}8^{+}$ С	0,821
АК $CD11b/c^{+}$ С — АК $CD4^{+}25^{+}$ С	0,785	АК $CD4^{-}8^{+}$ С — АК $CD4^{+}25^{+}$ С	0,892
АК $CD3^{+}$ С — АК $CD4^{+}8^{-}$ С	0,892	АК $CD4^{-}8^{+}$ С — АК $CD4^{+}8^{-}$ С	0,928
АК $CD3^{+}$ С — АК $CD4^{+}25^{+}$ С	0,857	Доля $CD3^{+}$ С — доля $CD45RA^{+}$ С	-0,964
АК $CD4^{-}8^{+}$ Т — АК $CD11b/c^{+}$ С	0,885	Доля $CD4^{-}8^{+}$ Т — доля $CD4^{-}8^{+}$ С	0,900
		Доля $CD4^{-}8^{+}$ С — доля $CD4^{+}25^{+}$ С	-0,900
		Доля $CD4^{-}8^{+}$ С — доля $CD4^{+}8^{+}$ Т	-0,900

Примечание. r — коэффициент корреляции Спирмена (все приведенные коэффициенты корреляции значимы при $P < 0,05$); С — селезенка; Т — тимус; АК — абсолютное количество клеток в органе ($\times 10^6$); Л — липофусцин (интенсивность аутофлюоресценции, усл.ед.).

лых клеток в органе ($CD4^{+}8^{+}$). Корреляционные связи между численностью различных клеточных субпопуляций наблюдаются в основном внутри

одного органа — тимуса или селезенки. Выявлена только одна межорганная положительная связь между абсолютным числом $CD4^{-}8^{+}$ -timoцитов и

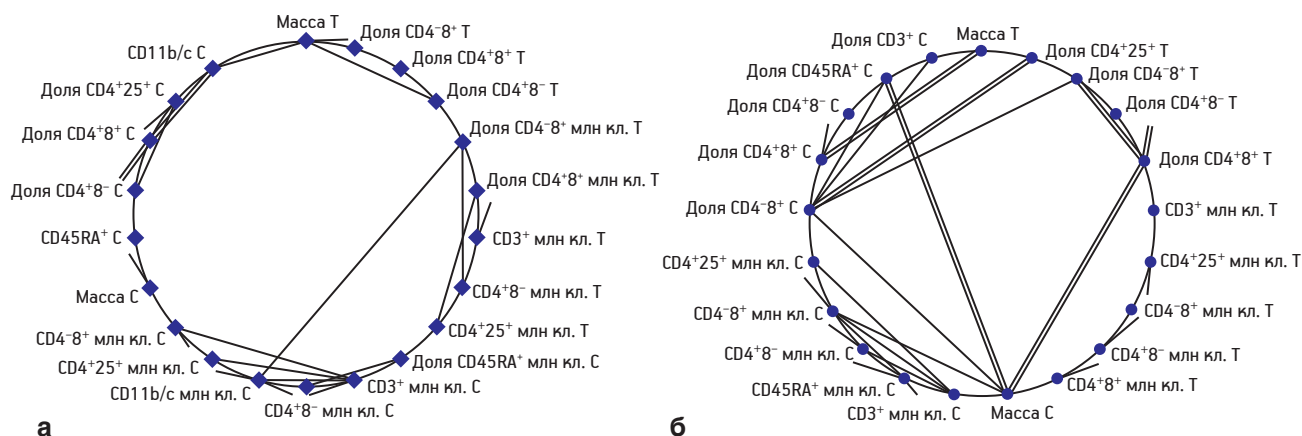


Рис. 3. Корреляционные связи между массой и клеточным составом органов иммунной системы у крыс при естественном световом режиме (а) и круглосуточном освещении (б).

Все обозначения те же, что на рис. 2

CD11b/c⁺-лимфоцитов селезенки. При КО количество, знак и направленность связей между показателями клеточного состава лимфоидных органов меняются, при этом увеличивается количество межорганных корреляционных связей между клеточным составом тимуса и селезенки (см. рис. 3, б; таблицу).

Обсуждение полученных данных. Ранее было показано, что КО оказывает влияние на состояние иммунной системы — нарушает суточные ритмы клеточного состава лимфоидных органов, процессы пролиферации и центральной дифференцировки Т-лимфоцитов [5, 6]. Однако для характеристики состояния мультипараметрических систем, в том числе нейроиммуноэндокринной системы, имеют значение не только и не столько величины отдельных параметров, сколько их взаимоотношения между собой. Поэтому с целью получения более полной информации об иммунобиологических эффектах КО мы использовали основные положения концепции «мобилей», рассматривающей нейроэндокринно-иммунный гомеостаз как сложную систему компонентов, работающую во взаимосвязи всех ее составляющих, в которой напряженность функционирования определяется количеством и силой связей между отдельными параметрами [3]. Из результатов анализа корреляционных связей между массой лимфоидных органов и их клеточным составом можно сделать заключение, что при ЕО масса тимуса формируется за счет дифференцированных субпопуляций Т-лимфоцитов, а масса селезенки — за счет В-лимфоцитарной популяции. При КО масса селезенки связана только с численностью Т-лимфоцитов, что согласуется с полученными ранее данными о снижении содержания В-лимфоцитов в селезенке крыс под влиянием КО [6]. Вероятно, это связано с нарушением суточного ритма продукции кортикостерона [12] в усло-

виях блокады синтеза мелатонина КО, что может вызвать изменения интенсивности и направленности миграции лимфоцитов из кровеносного русла в лимфоидные органы и ткани, в частности в селезенку [8]. Обнаружено, что изменение светового режима оказывает влияние на процессы центрального Т-лимфопоэза. При ЕО выявлена отрицательная связь между относительным содержанием в тимусе CD4⁺8⁺-незрелых тимоцитов и CD4⁺8⁺ лимфоцитов (зрелые эффекторы/киллеры), что позволяет предполагать направление дифференцировки тимоцитов в сторону данной субпопуляции. При КО отрицательная корреляционная связь наблюдается между относительным содержанием CD4⁺8⁺- и CD4⁺8⁺-timoцитов, т. е. в этих условиях меняется направление дифференцировки тимоцитов в сторону субпопуляции хелперов-индукторов. Увеличение количества связей между субпопуляциями клеток тимуса и селезенки при КО свидетельствует о возросшей напряженности функционирования иммунной системы и возможных дезадаптационных реакциях в условиях нарушенных циркадианных ритмов [1, 3].

Эти иммунобиологические эффекты нарушения светового режима могут быть опосредованы нейроэндокринными сдвигами, среди которых центральное место принадлежит функции ШЖ. Продуцируемый ШЖ гормон мелатонин является основным регулятором циркадианных ритмов в организме млекопитающих, обеспечивая синхронизацию метаболических процессов с 24-часовым ритмом чередования света и темноты. Содержание животных при КО в течение 14 сут вызывает у них состояние десинхроноза [5], проявляющееся снижением массы и весового индекса ШЖ, тенденцией к накоплению в ней липофусцина. Причиной этому может являться подавление синтеза мелатонина постоянным освещением [2], а также стрессовая реакция на нарушение свето-

вого режима [4]. Как в том, так и в другом случае происходит увеличение уровня свободных радикалов, что приводит к повышению количества липофусцина [13]. Обнаружено, что при естественном освещении масса ШЖ находится в прямой корреляционной связи с содержанием Т-клеток в селезенке. Поскольку масса ШЖ отражает количество в ней мелатонина [9], можно предположить, что данная связь свидетельствует о роли гормона в регуляции периферического Т-клеточного звена иммунитета в физиологических условиях. При этом небольшое число связей говорит о наличии достаточного количества степеней свободы в нейроэндокринно-иммунной системе и ее высоких адаптационных возможностях [3]. При КО увеличивается количество связей между показателями, характеризующими состояние ШЖ и иммунной системы, что свидетельствует о возросшей напряженности межсистемных взаимоотношений [3]. Степень повреждения пинеалоцитов, маркером которого является накопление липофусцина, ассоциируется с уменьшением количества субпопуляций Т-лимфоцитов в селезенке, а снижение массы ШЖ — с увеличением доли незрелых тимоцитов. Эти изменения можно интерпретировать как результат снижения продукции мелатонина в ШЖ при КО [2].

Таким образом, у крыс КО вызывает изменение направленности клеточной миграции и дифференцировки в иммунной системе, рост напряженности функционирования иммунной системы и нейроэндокринно-иммунных взаимодействий, опосредованное, по всей вероятности, блокадой синтеза мелатонина ШЖ. Результаты исследования свидетельствуют о важной роли ШЖ в регуляции функций иммунитета в физиологических условиях и при нарушении светового режима.

ЛИТЕРАТУРА

- Ветлугина Т.П., Никитина В.Б., Невидимова Т.И. и др. Система иммунитета и уровень тревожности при адаптации человека к новым условиям жизнедеятельности. Фундаментальные исследования, 2012, № 9 (ч. 1), с. 17–21.
- Кветная Т.В. и Князькин И.В. Мелатонин: роль и значение в возрастной патологии. СПб., Изд-во ВМедА, 2003.
- Лебедев К.А. и Понякина И.Д. Иммунограмма в клинической практике. М., Наука, 1990.
- Линькова И.С., Полякова В.О. и Кветной И.М. Единый механизм ремоделирования межклеточного матрикса в ткани тимуса и эпифиза при старении. Успехи геронтол., 2011, т. 24, № 3, с. 420–422.
- Литвиненко Г.И., Шурлыгина А.В., Вербицкая Л.В. и др. Суточная динамика клеточного состава тимуса и лимфоузлов мышей в норме, при постоянном освещении и при введении мелатонина. Бюл. экспер. биол., 2005, т. 140, № 8, с. 181–185.
- Шурлыгина А.В., Мельникова Е.В., Пантелеева Н.Г. и др. Влияние экспериментального десинхрониза на органы

иммунной системы у крыс WAG и HUCAR. Бюл. экспер. биол., 2013, т. 155, № 5, с. 611–615.

- Borugian M.J., Gallagher R.P., Friesen M.C. et al. Twentyfour-hour light exposure and melatonin levels among shift workers. J. Occup. Environ. Med., 2005, v. 47, № 12, p. 1268–1275.
- Dhabhar F.S., Malarkey W.B., Neri E. and McEwen B.S. Stress-induced redistribution of immune cells — from barracks to boulevards to battlefields: a tale of three hormones — Curt Richter Award winner. Psychoneuroendocrinology, 2012, v. 37, № 9, p. 1345–1368.
- Feng P., Hu Y., Vurbic D. and Guo Y. Maternal stress induces adult reduced REM sleep and melatonin level. Dev. Neurobiol., 2012, v. 72, № 5, p. 677–687.
- Kwiatkowski F. and Levi F. Chronobiology and immunity. Pathol. Biol. (Paris), 2005, v. 53, № 5, p. 251–254.
- Marmorstein A.D., Marmorstein L.Y., Sakaguchi H. and Hollyfield J.G. Spectral profiling of autofluorescence associated with lipofuscin, bruch's membrane, and sub-RPE deposits in normal and AMD eyes. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 2002, v. 43, № 7, p. 2435–2441.
- Ozkan S., Yalsin S., Babacanoglu E. et al. Photoperiodic lighting (16 hours of light:8 hours of dark) programs during incubation: 1. Effects on growth and circadian physiological traits of embryos and early stress response of broiler chickens. Poult Sci., 2012, v. 91, № 11, p. 2912–2921.
- Yin D. Is carbonyl detoxification an important anti-aging process during sleep? Med. Hypoth., 2000, v. 54, № 4, p. 519–522.

Поступила в редакцию 14.01.2014

INTERRELATIONS OF PINEAL GLAND MORPHO-FUNCTIONAL INDICES AND IMMUNE SYSTEM ORGANS IN RATS EXPOSED TO NATURAL ILLUMINATION REGIME AND CONTINUOUS ILLUMINATION

G.I. Litvinenko, A.V. Shurlygina, O.B. Gritsyk, Ye. V. Mel'nikova, P.A. Avrorov, M.V. Tenditnik and V.A. Trufakin

The objective of this investigation was to determine the complex response of the pineal gland (PG) and of the organs of the immune system in Wistar rats in response to a violation of the illumination regime in the experiment. Animals were kept under natural light regime and continuous illumination for 14 days. After that rats were sacrificed and the mass of the body, PG, gonads, thymus and spleen was measured. Thymus and spleen cell subpopulations were determined by flow cytometry. The lipofuscin content in PG was determined by measuring an autofluorescence intensity in frozen tissue sections in the wavelength range of 505–545 nm using a confocal laser scanning microscope LSM 510 META (Carl Zeiss). The correlation analysis showed an increase in the amount and the change of sign and direction of relations between the indices of the state of PG and the immune system. This indicates the up-regulation of the intensity of inter-system relationships and the change of migration and differentiation vector of immunocompetent cells.

Key words: lymphocytes, pineal gland, lipofuscin, continuous illumination

Laboratory of Chronophysiology, RAMS Siberian Branch Scientific Research Institute of Physiology and Fundamental Medicine; Laboratory of Immunomorphology, RAMS Siberian Branch Scientific Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology, Novosibirsk