

УДК 57.034:577.217.5+57.085.23

## МЕЛАТОНИН УСИЛИВАЕТ СИНТЕЗ БЕЛКА И СИНХРОНИЗИРУЕТ РИТМ СИНТЕЗА В КУЛЬТУРАХ ГЕПАТОЦИТОВ СТАРЫХ КРЫС<sup>1</sup>

© 2008 г. В. Я. Бродский, В. А. Голиченков\*, Н. Д. Звездина, Т. К. Дубовая\*\*, В. И. Фатеева, Л. А. Мальченко, О. В. Бурлакова\*, А. Ю. Беспярых\*

*Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН*

*119334 Москва, ул. Вавилова, д. 26*

*\*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова*

*119992 Москва, Ленинские горы*

*\*\*Российский государственный медицинский университет*

*117997 Москва, ул. Островитянова, д. 1*

*E-mail: brodsky.idb@bk.ru*

*Поступила в редакцию 10.12.07 г.*

*Окончательный вариант получен 19.12.07 г.*

На первичных суточных культурах гепатоцитов крысы на стеклах в бессывороточной среде исследовано действие мелатонина в концентрации от 1 до 1000 нМ. Показано, что в минимальной дозе (1 нМ) мелатонин синхронизирует колебания синтеза белка в несинхронных разреженных культурах гепатоцитов крыс разного возраста и в них выявляется окологосударственный ритм синтеза белка. В плотных слабо синхронизированных гепатоцитах старых крыс (возраст около 2.5 лет, вес около 600 г) мелатонин увеличивает степень синхронизации клеток до уровня культур молодых животных. После обработки мелатонином у крыс разного возраста повышается средний уровень синтеза белка.

*Ключевые слова:* межклеточные взаимодействия, самоорганизация клеток, старение, гепатоциты, мелатонин, ритм синтеза белка.

Ранее было показано, что колебания интенсивности синтеза белка в культурах гепатоцитов синхронизируются ганглиозидами и биогенными аминами – серотонином, норадреналином, а также его фармакологическими аналогами фенилэфрином и изопротеренолом. В результате синхронизации индивидуальных колебаний в клеточной популяции организуется суммарный окологосударственный ритм синтеза белка (Бродский и др., 1997, 2006; Звездина и др., 2003, 2008). Как известно, ганглиозиды и биогенные амины повышают концентрацию ионов кальция в цитоплазме разных клеток, включая и гепатоциты. Значимой находкой было обнаружение влияния кальциевых агонистов на кооперативную активность гепатоцитов старых крыс и, соответственно, на выраженность ритма синтеза белка в этих клетках (Бродский и др., 2005). Очевидно, что степень кооперации клеток в формировании любого суммарного ритма характеризуется амплитудой (размахом) ритма: чем более амплитуда, тем синхроннее индивидуальные колебания. Мы

показали, что амплитуда синтеза белка в гепатоцитах старых животных в среднем вдвое ниже, чем у молодых. Введение в культуральную среду ганглиозидов (суммарно из мозга быка или одного GM1) или фенилэфрина повышало амплитуду ритма синтеза белка в гепатоцитах старых крыс до уровня молодых.

Одним из факторов изменения концентрации ионов кальция в цитоплазме является мелатонин (Sjoblom et al., 2003). Этот гормон эпифиза участвует во многих биологических процессах и давно используется в клинической практике, в частности в геронтологической и гастроэнтерологической (Arendt, 1995; Мелатонин ..., 2004). Может ли мелатонин синхронизировать ритм синтеза белка? Влияет ли мелатонин на кооперативную активность клеток старых животных, на самоорганизацию суммарного ритма синтеза белка в гепатоцитах? Известно, что мелатонин активирует протеинкиназу С (Sampson et al., 2006). Согласно нашим данным (Бродский и др., 2006), фосфорилирование белков – ключевой процесс самоорганизации ритма синтеза белка в культурах гепатоцитов.

<sup>1</sup> Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (проекты № 06-04-48109, 05-04-48293).

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Как и ранее (см. выше ссылки на наши работы), гепатоциты самцов крыс Вистар разного возраста культивировали на стеклах в среде 199 с добавлением 0.2 мг/мл альбумина и 0.5 мкг/мл инсулина ("Sigma", США). Плотные культуры с близко расположенными клетками получали при введении в чашку Петри над стеклами, покрытыми коллагеном, около  $10^6$ /мл изолированных гепатоцитов. Разреженные культуры получали из той же суспензии клеток, разведенной примерно в 10 раз. Исследовали суточные культуры.

Метод оценки интенсивности синтеза белка также был неоднократно описан ранее. Определяли включение  $^3\text{H}$ -лейцина в белки и пул свободного меченого лейцина в той же культуре. Рассчитывали величину  $I_{\text{сорт}}$  – включение лейцина, относительное к пулу, вводя поправку как на вариабельность пула, так и на различное число клеток в культурах. В течение 2 ч последовательно каждые 10 мин брали три параллельные пробы культур; для каждой культуры определяли  $I_{\text{сорт}}$  и рассчитывали среднее и ошибку для определенной точки времени. Каждый опыт ставили на гепатоцитах одной и той же крысы.

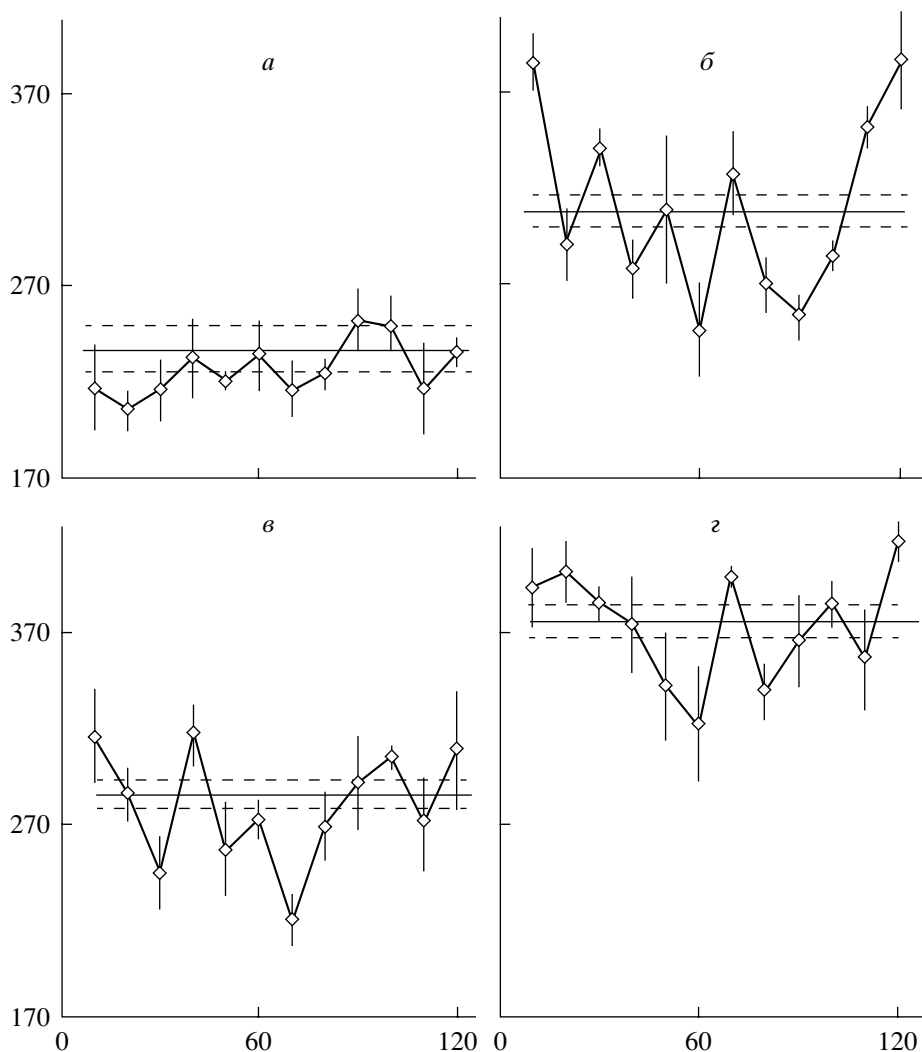
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Сначала требовалось выяснить: влияет ли мелатонин на самоорганизацию ритма синтеза белка в гепатоцитах *in vitro* и, если ответ положительный, какие дозы мелатонина могут быть эффективными? В опыте, приведенном на рис. 1, исследование проводили на разреженных несинхронных культурах гепатоцитов. Через 1 сут культивирования в бессывороточной среде культуры отмывали и помещали в такую же свежую среду. Контрольные культуры через 30 мин вновь отмывали и переносили в свежую среду еще на 30 мин, после чего брали пробы для измерения включения  $^3\text{H}$ -лейцина. В контроле, как обычно (см. наши цитированные выше работы), ритм синтеза белка не выявлялся: в разные промежутки времени все средние достоверно не отличались друг от друга, и их ошибки находились в пределах средней  $\pm$  ошибки для всех точек этого опыта (рис. 1, а). Такие же культуры, полученные из той же взвеси изолированных гепатоцитов, после первого отмывания переносили в среду с мелатонином на 30 мин, после чего культуры отмывали и переносили на 30 мин в свежую нормальную среду (без мелатонина), откуда через 30 мин брали пробы. Исследовали кинетику синтеза белка после обработки культур 1, 500 или 1000 нМ мелатонином. Во всех случаях нашли достоверный суммарный ритм в культурах гепатоцитов. Мелатонин также повышал средний уровень синтеза белка (рис. 1, б–г).

В других опытах снижали минимальную дозу и время действия мелатонина. Доза 0.5 нМ была неэффективной для организации ритма синтеза белка, тогда как обработка разреженных культур мелатонином в дозах от 1 до 200 нМ в течение 5 мин оказалась достаточной для синхронизации культур и выявления ритма (рис. 2). После 5 мин обработки культур мелатонином их переносили в свежую нормальную среду, и через 10 мин исследовали кинетику синтеза белка. Так же, как в опыте, результаты которого представлены на рис. 1, мелатонин повышал средний уровень синтеза белка сравнительно с контролем.

В опытах на старых крысах (возраст около 2.5 лет, вес 580–670 г) исследовали плотные культуры гепатоцитов с близко расположенными клетками. Ранее было показано, что в плотных культурах ритм синтеза белка выявляется и у молодых, и у старых крыс уже через 15–20 мин после их помещения в свежую среду. Но амплитуда ритма, характеризующая синхронность клеток, была существенно ниже в культурах гепатоцитов старых крыс, чем у молодых (Бродский и др., 2005). Добавление ганглиозидов или фенилэфрина в среду с культурами гепатоцитов старых крыс повышало амплитуду ритма клеток старых крыс до уровня молодых. Был сделан вывод о том, что изменения свойств гепатоцитов старых животных обусловлены старческими изменениями свойств межклеточной среды. Вывод о значимости межклеточной среды для свойств клеток старой крысы, их кооперации в организации ритма синтеза белка подтвердился при изучении действия мелатонина. В одном из опытов (рис. 3) амплитуда ритма синтеза белка в плотных контрольных культурах гепатоцитов старой крысы по отношению к среднему уровню синтеза белка для данной кривой была в среднем 26%, тогда как в таких же культурах, обработанных мелатонином в концентрации 1 нМ, она увеличилась до 44, а в концентрации 50 нМ – до 42%. Существенный прирост среднего уровня синтеза белка отмечен в этом опыте только после внесения в среду 50 нМ мелатонина. В других опытах синтез повышался и после добавления 1 нМ мелатонина.

Итак, наряду с другими изученными кальциевыми агонистами мелатонин служит сигналом к самоорганизации ритма синтеза белка. Сигнальная функция мелатонина ярко проявилась в гепатоцитах старых крыс: гормон не только повышал степень синхронизации клеток, но и увеличивал средний уровень синтеза белка, существенно сниженный в гепатоцитах старых животных по сравнению с молодыми. Как и в случае других сигнальных молекул, снижение синхронности клеток старых животных обусловлено изменениями свойств межклеточной среды. Как известно, с возрастом в сыворотке крови, т.е. в межклеточной среде *in situ*, падает концентрация ганглиози-

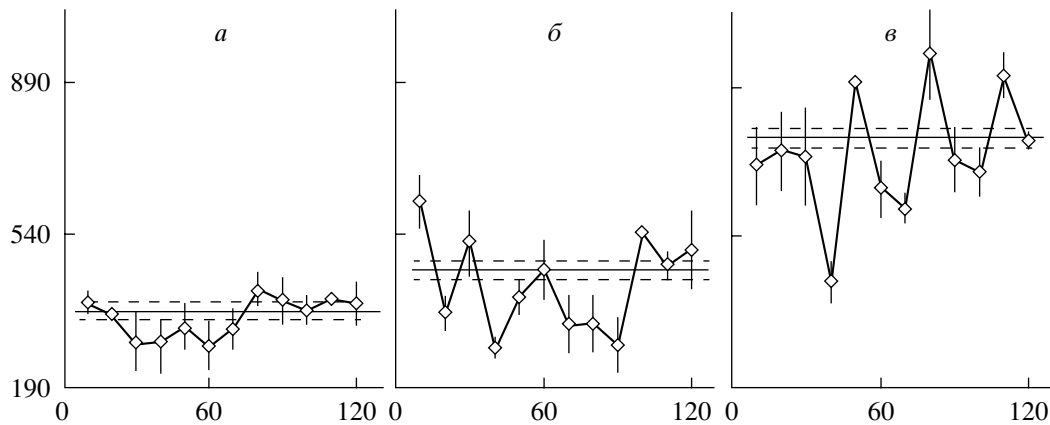


**Рис. 1.** Кинетика синтеза белка в разбавленных культурах 3-месячной крысы после 30 мин обработки мелатонином в разных дозах. Через 1 сут культивирования в бессывороточной среде культуры были отмыты и: *а* – помещены в свежую нормальную среду на 30 мин, вновь отмыты и помещены в свежую среду еще на 30 мин с последующим взятием из той же среды проб с  $^3\text{H}$ -лейцином – контроль; *б* – такие же разбавленные культуры, полученные из той же взвеси изолированных гепатоцитов, после первого отмытия на 30 мин переносили в среду с мелатонином в дозе 1 нМ, после чего культуры отмывали и переносили на 30 мин в свежую нормальную среду, откуда через 30 мин брали пробы; *в* – то же, концентрация мелатонина 500 нМ; *г* – то же, концентрация мелатонина 1000 нМ.

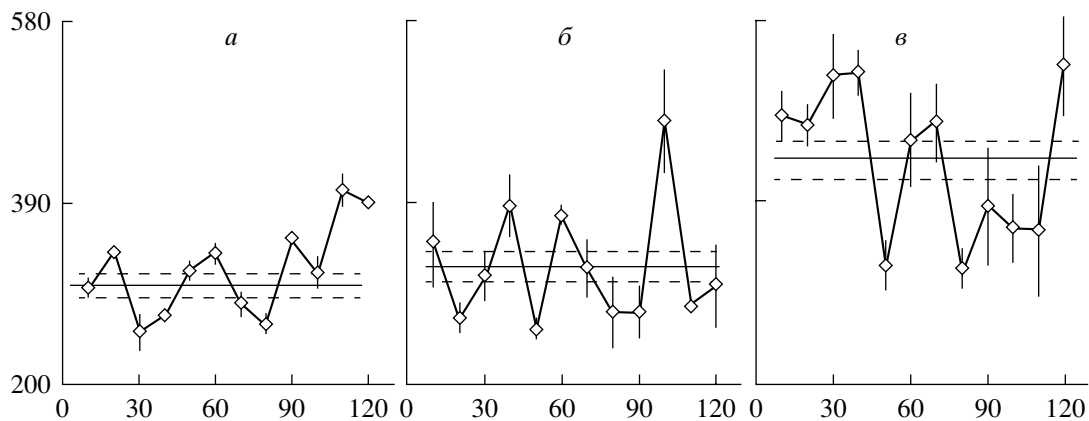
Здесь и на рис. 2, 3: по оси абсцисс – время культивирования, мин; по оси ординат –  $I_{\text{сонт}}$ , имп/мин.

дов и норадреналина (см.: Бродский и др., 2005). В старости также снижается активность эпифиза и, соответственно, уменьшается содержание мелатонина в тканях и сыворотке крови (Tang et al., 1985; Анисимов, 2004). Добавление в сыворотку крови старой крысы ганглиозидов и введение такой обогащенной сыворотки в среду с культурами гепатоцитов старой крысы повышало кооперацию гепатоцитов в организации ритма синтеза белка (Бродский и др., 2005). Возможно, к тому же эффекту приведет и обогащение сыворотки мелатонином. Известно, что введение мелатонина старым крысам усиливало антиоксидантную систему до уровня, характерного для молодых животных (Kireev et al., 2007).

В монографии о действии мелатонина на желудочно-кишечный тракт печень отмечается в основном как место разрушения этого гормона перед выведением его из организма (Мелатонин ..., 2004). Экзогенный мелатонин действительно метаболизируется в печени. Но в нашей работе выяснилось, что он влияет на сами гепатоциты, являясь одним из сигнальных факторов самоорганизации ритма синтеза белка в паренхиме печени. Среди других выявленных сигнальных факторов – ганглиозидов, катехоламинов и серотонина (Звездина и др., 2008) – мелатонин оказался самым эффективным, синхронизируя колебания скорости синтеза белка уже в концентрации 1 нМ (для сравнения: норадреналин действует в концентрации 20 мкМ,



**Рис. 2.** Кинетика синтеза белка в разреженных культурах 3-месячной крысы после 5 мин обработки мелатонином. Через 1 сут культивирования в бессывороточной среде культуры были отмыты и: *a* – помещены в свежую среду, через 5 мин отмыты и перенесены на 10 мин в новую свежую среду, откуда через 10 мин брали пробы – контроль; *b* – такие же разреженные культуры, полученные из той же взвеси изолированных гепатоцитов, после первого отмыывания переносили на 5 мин в среду с мелатонином в концентрации 1 нМ, после чего отмыывали и переносили в свежую нормальную среду, откуда через 10 мин брали пробы; *v* – то же, концентрация мелатонина – 50 нМ.



**Рис. 3.** Кинетика синтеза белка в плотных культурах 2-летней крысы (вес 600 г) после 5 мин обработки мелатонином. Через 1 сут культивирования в бессывороточной среде плотные культуры были отмыты и: *a* – помещены в свежую среду, через 5 мин отмыты и перенесены на 10 мин в новую свежую среду, откуда через 10 мин брали пробы – контроль; *b* – такие же культуры после первого отмыывания переносили на 5 мин в среду с мелатонином в концентрации 1 нМ, после чего их отмыывали и переносили в свежую нормальную среду, откуда через 10 мин брали пробы; *v* – то же, концентрация мелатонина – 50 нМ.

его аналоги – фенилэфрин, изопротеренол и серотонин – в дозе 2–3, 10 и 20 мкМ соответственно; ганглиозиды суммарно – 0.3–0.5 мкМ, GM1 – около 0.1 мкМ).

Перспективы продолжения исследований эффектов мелатонина видятся, во-первых, в выяснении механизма действия этого сигнального фактора на самоорганизацию ритма синтеза белка и других метаболических околочасовых ритмов, например активности ферментов, концентрации АТФ и т.д. Стимулирует ли мелатонин активность протеинкиназ и фосфорилирование белков в гепатоцитах? Ранее было показано, что фосфорилирование белков – ключевой процесс самоор-

ганизации ритма синтеза белка в гепатоцитах, а также ритма активности ферментов в разных клетках (Бродский и др., 2006; Brodsky, 2006). Также значимо изучение влияния мелатонина на самоорганизацию ритма синтеза белка после введения гормона не в культуральную среду, а в организм крысы. Такие опыты приблизят аналитические данные к клиническому использованию мелатонина при поражениях печени. Перспективно продолжить исследования эффектов мелатонина на печень старых животных, в частности на метаболические ритмы гепатоцитов, включая ритм синтеза белка.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Анисимов В.Н. Возрастные изменения функции эпифиза // Мелатонин в норме и патологии / Под ред. Комарова Ф.И. и др. М.: Медпрактика, 2004. С. 20–34.
- Бродский В.Я., Нечаева Н.В., Звездина Н.Д. и др. Синхронизация ритма синтеза белка в культурах гепатоцитов происходит при кондиционировании среды с накоплением ганглиозида GM1 в клетках: Иммуноцитохимическое исследование // Изв. АН. Сер. биол. 1997. № 4. С. 389–399.
- Бродский В.Я., Нечаева Н.В., Звездина Н.Д. и др. Возрастные особенности ритма синтеза белка в гепатоцитах. Влияние межклеточной среды // Онтогенез. 2005. Т. 36. № 1. С. 9–17.
- Бродский В.Я., Звездина Н.Д., Фатеева В.И., Мальченко Л.А. Механизм прямых межклеточных взаимодействий. Самоорганизация ритма синтеза белка // Там же. 2006. Т. 37. № 5. С. 384–393.
- Звездина Н.Д., Нечаева Н.В., Грачева Е.В. и др. Нарушение кооперации гепатоцитов в ритме синтеза белка хелатором цитоплазматического кальция ВАРТА-АМ // Изв. АН. Сер. биол. 2003. № 1. С. 14–19.
- Звездина Н.Д., Мальченко Л.А., Фатеева В.И., Бродский В.Я. Сигнальные факторы самоорганизации ритма синтеза белка: ганглиозиды и катехоламины функционируют независимо друг от друга // Онтогенез. 2008. Т. 39. № 3. С. 198–207.
- Мелатонин в норме и патологии / Под ред. Комарова Ф.И. и др. М.: Медпрактика, 2004. 308 с.
- Arendt J. Melatonin and the mammalian pineal gland. L.: Chapman and Hall., 1995. 331 p.
- Brodsky V.Y. Direct cell-cell communication: a new approach derived from recent data on the nature and self-organisation of ultradian (circahoralian) intracellular rhythms // Biol. Rev. Cambridge Philosoph. Soc. 2006. V. 81. P. 143–162.
- Kireev R.A., Tresuerres A.C., Castillo C. et al. Effect of exogenous administration of melatonin and growth hormone on pro-antioxidant functions of the liver in aging male rats // J. Pineal Glands. 2007. V. 42. P. 64–70.
- Sampson S.R., Lupowitz Z., Braiman L., Zisapel N. Role of protein kinase C-alpha in melatonin signal transduction // Mol. Cell Endocrinol. 2006. V. 252. P. 82–87.
- Sjoblom M., Safsten B., Flemstrom G. Melatonin induced signaling in clusters of human and rat duodenal enterocytes // Amer. J. Physiol. 2003. V. 284. P. 1034–1044.
- Tang F., Hadjucinstaninou M., Panf S.F. Aging and diurnal rhythms of pineal serotonin, 5-hydroxyindolacetic acid, norepinephrine, dopamine and serum melatonin in the male rats // Neuroendocrinology. 1985. V. 40. P. 160–164.

## Melatonin Promotes and Synchronizes Protein Synthesis in Hepatocyte Culture from Old Rats

V. Ya. Brodsky<sup>a</sup>, V. A. Golichenkov<sup>b</sup>, N. D. Zvezdina<sup>a</sup>, T. K. Dubovaya<sup>c</sup>, V. I. Fateeva<sup>a</sup>, L. A. Mal'chenko<sup>a</sup>, O. V. Burlakova<sup>b</sup>, and A. Yu. Bespyatykh<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Kol'tsov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 26, Moscow, 119991 Russia

<sup>b</sup> Moscow State University, Moscow, 119992 Russia

<sup>c</sup> Russian State Medical University, ul. Ostrovitjanova 1, Moscow, 117997 Russia

e-mail:brodsky.idb@bk.ru

**Abstract**—The effect of 1 to 1000 nM melatonin was studied on daily cultures of rat hepatocytes on slides in serum-free medium. The minimum melatonin concentration (1 nM) proved to synchronize protein synthesis in asynchronous sparse cultures of hepatocytes from rats of different age, and a circahoralian rhythm of protein synthesis was revealed in them. In dense weekly synchronous hepatocytes from old rats (2.5 years old with the weight of about 600 g), melatonin improved cell synchronization to the level of young animals. Melatonin treatment increased the mean rate of protein synthesis in rats of different age.

**Key words:** cell–cell interactions, cell self-organization, aging, hepatocytes, melatonin, protein synthesis rhythm.