

УДК 57.034:577.217.5+57.085.23

## МЕЛАТОНИН СИНХРОНИЗИРУЕТ РИТМ СИНТЕЗА БЕЛКА В КУЛЬТУРАХ ГЕПАТОЦИТОВ КАК АГОНИСТ ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО КАЛЬЦИЯ И ПРОТЕИНКИНАЗ<sup>1</sup>

© 2009 г. В. Я. Бродский, В. А. Голиченков\*, Н. Д. Звездина, В. И. Фатеева, Л. А. Мальченко

*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*

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

*Поступила в редакцию 13.03.08 г.*

Мелатонин в наномолярных концентрациях синхронизирует ритм синтеза белка в первичных культурах гепатоцитов путем кальцийзависимой активации протеинкиназ. Синхронизирующий эффект мелатонина блокируется хелатором цитоплазматического кальция ВАРТА-АМ (20 мкМ), а также ингибитором протеинкиназ 1-(5-изохинолинсульфонил)-5-метилпиперазин дигидрохлоридом (40 мкМ). Таким образом, основное событие синхронизации гепатоцитов мелатонином – фосфорилирование белков, что ранее было нами показано также для ганглиозидов и биогенных аминов. Антагонист рецепторов мелатонина лузиндол (20 нМ) блокирует синхронизирующую функцию мелатонина.

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

Ряд сигнальных факторов, стимулируя увеличение концентрации свободных ионов кальция в цитоплазме, синхронизирует колебания скорости синтеза белка, приводя к выявлению суммарного окологлобального ритма в популяции гепатоцитов *in vitro* (Бродский и др., 2002, 2006). Сигнальными факторами в этих опытах являлись ганглиозиды гепатоцитов. Аналогичным образом действовали экзогенные ганглиозиды (препарат суммарных ганглиозидов мозга быка или индивидуальный моносиалоганглиозид GM1), а также фармакологический аналог норадреналина – фенилэфрин. Эффект синхронизации ритма синтеза белка был показан и для некоторых природных биогенных аминов – норадреналина и серотонина (Звездина и др., 2008), а также для мелатонина (Бродский и др., 2008). Этот гормон, введенный в среду с культивируемыми гепатоцитами, синхронизирует ритм синтеза белка в значительно меньших концентрациях, чем другие изученные сигнальные факторы, – 1 нМ ( $0.23 \times 10^{-6}$  мг/мл). Для сравнения: эффективные концентрации ганглиозидов GM1 – 0.06–0.2, фенилэфрина – 2–3, норадреналина – 15, серотонина – 20 мкМ.

Известно, что мелатонин стимулирует повышение концентрации свободных ионов кальция в цитоплазме эпителиальных клеток (см., например: Sjoblom et al., 2003). Подобным образом действуют на культивируемые гепатоциты ганглиозиды и некоторые катехоламины. В нашей работе требовалось выяснить, организуется ли ритм синтеза белка путем влияния мелатонина на концентрацию внутриклеточного кальция и на фосфорилирование белков, подобно тому, как это было нами показано для других сигнальных синхронизирующих факторов. Следовало также выяснить роль специфических рецепторов мелатонина в его синхронизирующей ритм синтеза белка функции.

Изучали первичные культуры гепатоцитов с разной плотностью расположения клеток на стеклах. В плотных культурах с близко расположенными клетками ритм синтеза белка обнаруживается практически сразу после смены среды, т.е. клетки таких культур быстро самосинхронизируются. В разреженных культурах, полученных из той же суспензии изолированных гепатоцитов при ее разведении примерно в 10 раз, ритм выявляется только через несколько часов, т.е. клетки разреженных культур исходно не синхронны. Для ингибирования эффектов цитоплазматического кальция использован его хелатор

<sup>1</sup> Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (проект № 06-04-48109).

ВАРТА-АМ, а для блокады протеинкиназ – их ингибитор Н7 (1-(5-изохинолинсульфонил)-5-метилпиперазин дигидрохлорид), влияющий, в основном, на протеинкиназу С. Механизм действия мелатонина через специфические рецепторы тестировали с использованием лузиндола – антагониста М1- и М2-рецепторов мелатонина (Sjoblom et al., 2003).

Значимость изучения механизмов действия мелатонина определяется тем, что этот гормон используется в лечении некоторых болезней сердечно-сосудистой системы (Малиновская и др., 2004а) и желудочно-кишечного тракта (Малиновская и др., 2004б). Мелатонин применяют также как антистрессорный фактор (Арушанян, 2004) и используют в качестве средства для нормализации продолжительности и качества сна (Ковальзон, Вейн, 2004). Изучается защитное действие мелатонина на процесс старения (Анисимов, 2004), а также его противоопухолевая активность (Анисимов и др., 2004).

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Гепатоциты самцов крыс Вистар 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, суспензии изолированных гепатоцитов (около  $10^6$  клеток/мл). Разреженные культуры получали из той же суспензии клеток, разведенной примерно в 10 раз. Исследовали суточные культуры (подробнее см.: Бродский и др., 2006, 2008).

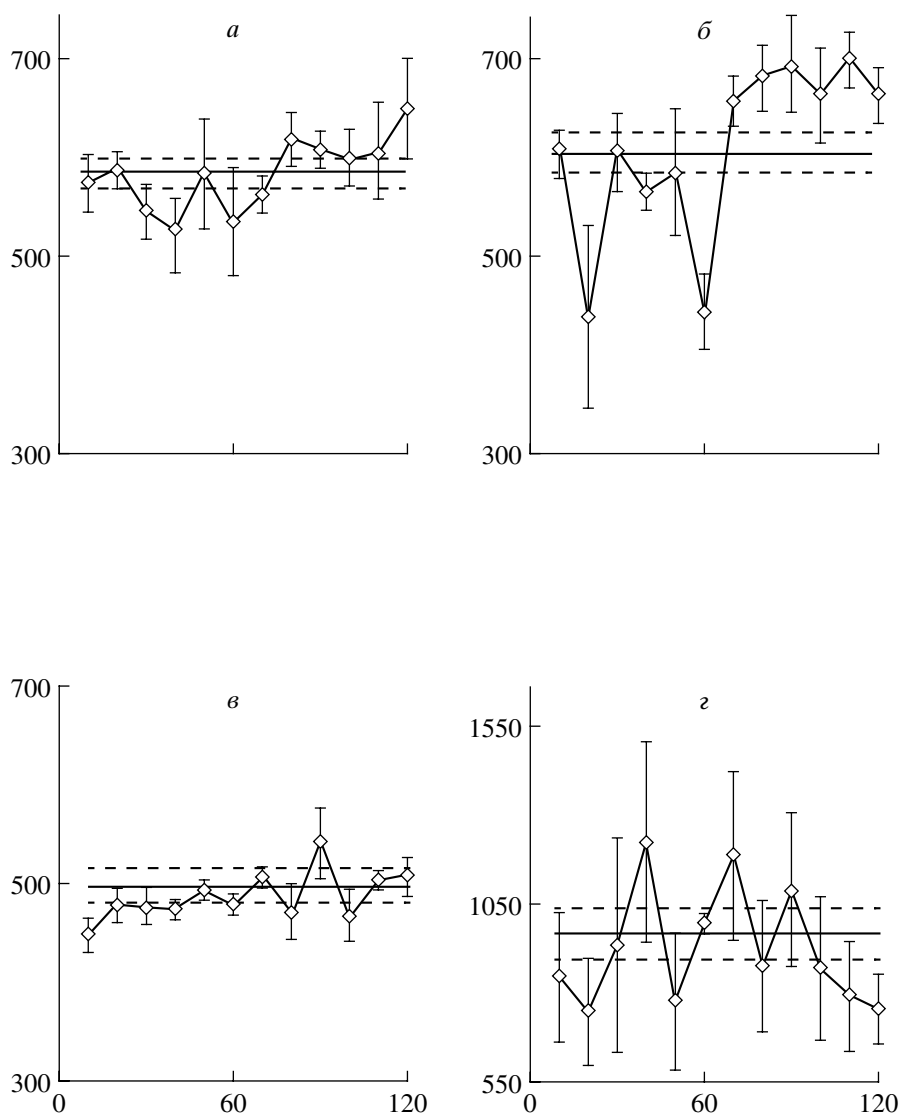
Метод оценки скорости синтеза белка неоднократно описан нами ранее. Определяли включение  $^3\text{H}$ -лейцина в белки и пул свободного меченого лейцина в той же культуре. Рассчитывали величину  $I_{\text{corr}}$  – включение лейцина в белки, отнесенное к пулу, автоматически вводя при этом поправку как на вариабельность пула, так и на различное число клеток в культурах. В течение 2 ч последовательно каждые 10 мин брали пробы (по три культуры в пробе); для каждой культуры определяли  $I_{\text{corr}}$  и рассчитывали среднее и ошибку для определенной точки времени, а затем общее среднее для данного варианта опыта. Каждый опыт ставили на культурах гепатоцитов одной и той же крысы.

Использовали следующие реактивы (“Sigma”, США): мелатонин, ВАРТА-АМ – хелатор внутриклеточного кальция, Н7 – ингибитор протеинкиназ, лузиндол – блокатор М1- и М2-рецепторов мелатонина.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В опыте, результаты которого представлены на рис. 1, выясняли роль ионов внутриклеточного кальция в синхронизации ритма синтеза белка, вызванной с помощью мелатонина. Исследовали разреженные и плотные первичные культуры гепатоцитов молодой крысы. Так же как и ранее (Бродский и др., 2005–2008), в контрольных разреженных культурах ритм синтеза белка не был обнаружен. Средние значения скорости синтеза белка в течение 2 ч наблюдения достоверно не отличались друг от друга и от общей средней для всех точек в пределах ошибки этой средней. Другим контролем действия ВАРТА-АМ было изучение плотных культур. В свежей среде в таких культурах всегда находят ритм синтеза белка, обработка же таких культур ВАРТА-АМ блокировала синхронизацию клеток, и ритм синтеза белка не был обнаружен. Как было показано ранее (Бродский и др., 2008), мелатонин синхронизировал разреженные культуры, и в них обнаружили ритм синтеза белка. После предобработки культур ВАРТА-АМ и при дальнейшем совместном действии ВАРТА-АМ и мелатонина этот гормон не синхронизировал разреженные культуры, и ритм в них не выявлялся.

Торможение активности протеинкиназ ингибитором Н7 блокировало синхронизирующий эффект мелатонина (рис. 2). Исследовали плотные культуры гепатоцитов старой крысы (возраст – 30 мес, вес – 580 г). Ранее в таких культурах находили ритм синтеза белка, хотя и более слабо выраженный, чем в культурах гепатоцитов молодых крыс (Бродский и др., 2005); то же обнаружено и в настоящей работе в контроле (рис. 2). В среду других таких же культур вносили мелатонин (2 нМ) на 5 мин, после чего культуры отмывали и исследовали синтез белка в свежей среде. Средний уровень синтеза белка заметно возрастал, что было отмечено для мелатонина и ранее (Бродский и др., 2008). В третьем варианте того же опыта плотные культуры после отмывки помещали в среду с ингибитором протеинкиназ Н7 на 40 мин, куда в последние 5 мин культивирования вносили 2 нМ мелатонина. В этом случае ритм синтеза белка не был обнаружен, т.е. синхронизирующий эффект мелатонина не проявлялся после подавления активности протеинкиназ. В течение 2 ч наблюдения пробы плотных культур не отличались по интенсивности синтеза белка друг от друга. В четвертом варианте опыта в качестве дополнительного контроля использовали эффективность синхронизирующего действия ранее изученного сигнального фактора фенилэфрина на фоне Н7. Без Н7 фенилэфрин, как

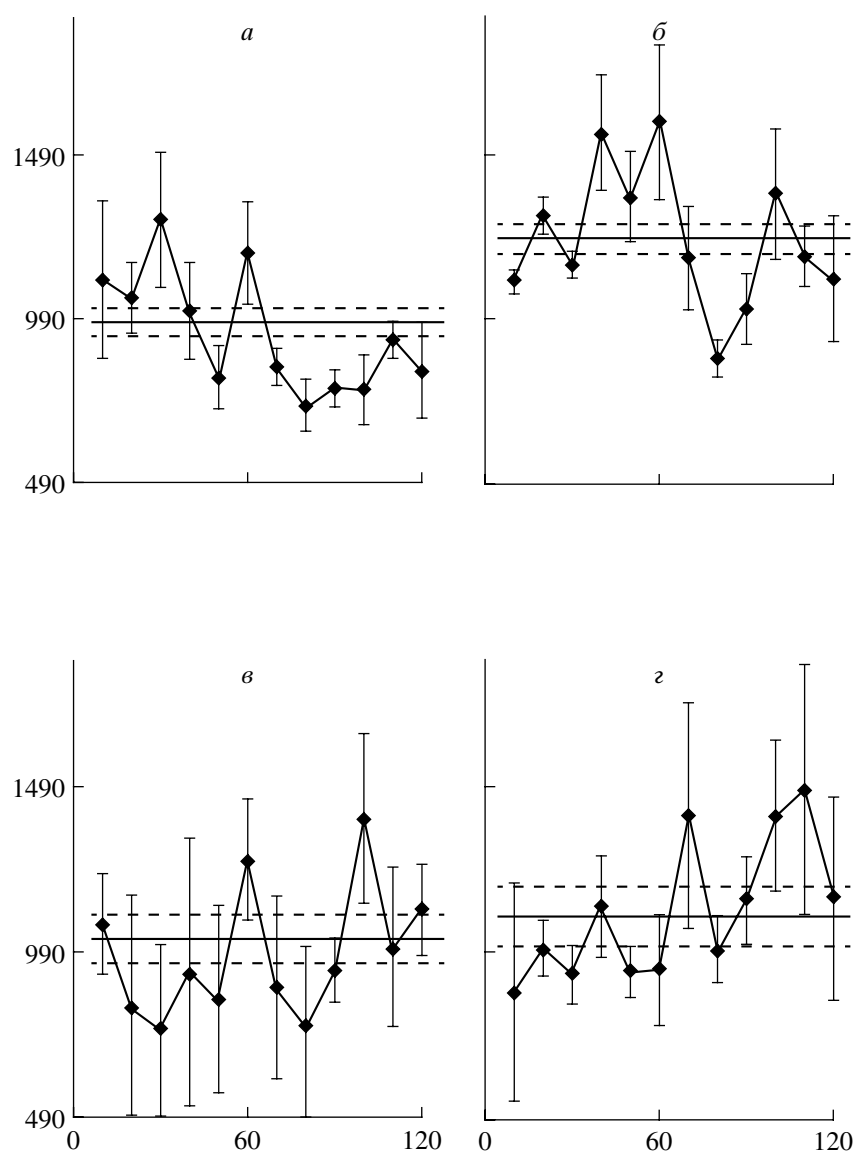


**Рис. 1.** Влияние ВАРТА-АМ – хелатора ионов Са – на вызванную мелатонином синхронизацию ритма синтеза белка в отмытых суточных культурах гепатоцитов молодой крысы: *a* – контроль, разреженные культуры инкубировали 30 мин в свежей среде с 0.1%-ным ДМСО – растворителем ВАРТА-АМ, отмывали, вновь инкубировали 30 мин в свежей среде с ДМСО, откуда в течение 2 ч брали пробы; *б* – после 25 мин инкубации разреженных культур с ДМСО в среду вносили 5 нМ мелатонина еще на 5 мин, затем культуры отмывали и вновь инкубировали 30 мин в свежей среде с ДМСО, откуда в течение 2 ч брали пробы; *в* – после 25 мин инкубации разреженных культур с 20 мкМ ВАРТА-АМ и ДМСО в среду вносили 5 нМ мелатонина на 5 мин инкубации, затем культуры отмывали и вновь инкубировали 30 мин в свежей среде с ДМСО, откуда в течение 2 ч брали пробы; *г* – плотные культуры инкубировали 30 мин в среде с 20 мкМ ВАРТА-АМ и ДМСО, отмывали и инкубировали 30 мин в свежей среде с ДМСО, откуда в течение 2 ч брали пробы.

Здесь и далее: в каждой пробе брали параллельно три культуры и для каждой измеряли  $I_{corr}$  и рассчитывали среднюю для каждой точки времени (—), а также ошибку этой средней (— —); по оси абсцисс – время, мин, по оси ординат –  $I_{corr}$ , имп/мин.

известно, синхронизирует разреженные культуры и повышает амплитуду синтеза белка в плотных культурах старой крысы (Бродский и др., 2002, 2006). В среде с Н7 действие фенилэфрина блокировалось, и он не синхронизировал разреженные культуры молодой крысы.

Таким образом, мелатонин синхронизирует ритм синтеза белка, инициируя цепь реакций: мелатонин → увеличение концентрации внутриклеточного кальция → активация протеинкиназ → фосфорилирование белков. В результате происходит синхронизация индивидуальных клеток.

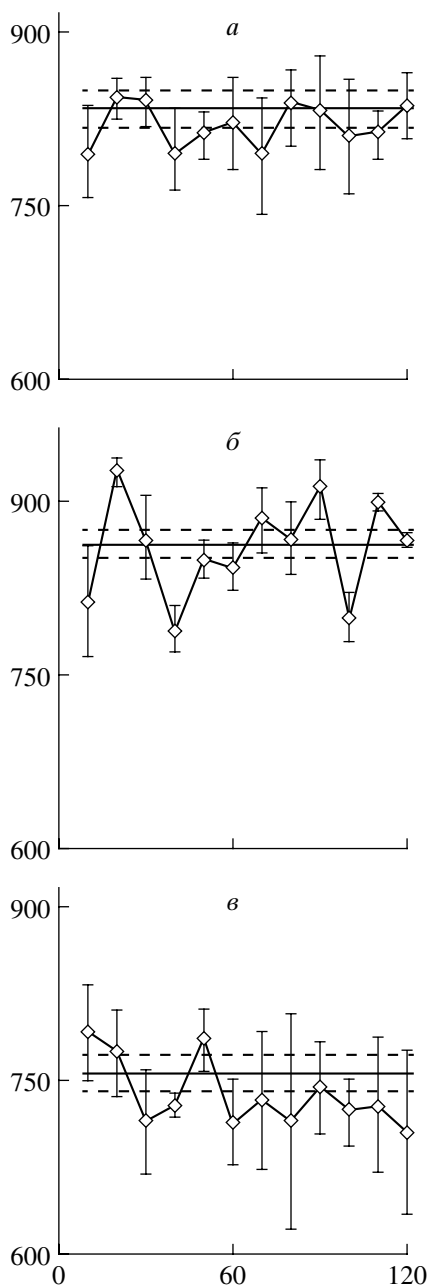


**Рис. 2.** Влияние ингибитора активности протеинкиназы H7 на вызванную мелатонином синхронизацию ритма синтеза белка в плотных суточных культурах гепатоцитов старой крысы: *а* – контроль, культуры инкубировали 40 мин в свежей среде, отмывали, вновь инкубировали 20 мин в свежей среде, откуда в течение 2 ч брали пробы; *б* – после 35 мин инкубации в среду вносили 5 нМ мелатонина на 5 мин, затем культуры отмывали и вновь инкубировали 20 мин в свежей среде, откуда в течение 2 ч брали пробы; *в* – после 35 мин инкубации в среде с 40 мкМ H7 в среду вносили 5 нМ мелатонина на 5 мин, затем культуры отмывали и вновь инкубировали 20 мин в свежей среде, откуда в течение 2 ч брали пробы; *г* – после 38 мин инкубации в среде с 40 мкМ H7 вносили 2 мкМ фенилэфрина на 2 мин, затем культуры отмывали и вновь инкубировали 20 мин в свежей среде, откуда в течение 2 ч брали пробы.

Такой же путь выявлен нами ранее при изучении синхронизирующего действия ганглиозидов и биогенных аминов.

В следующей серии опытов (рис. 3) выясняли влияние рецепторов мелатонина на его синхронизирующую функцию. Известны два типа рецепторов мелатонина – M1 и M2 (см., например, обзор: Анисимов, 2004). Агонисты рецепторов мелатонина вы-

зывают такие же изменения концентрации ионов кальция в эпителиальных клетках, как сам мелатонин, а антагонисты рецепторов блокируют этот эффект (Sjoblom et al., 2003). Описаны также подобные эффекты лузиндола для разных типов клеток в диапазоне концентраций от 10 до 2000 нМ. Мы исследовали суточные разреженные культуры гепатоцитов молодой крысы. В контрольных разрежен-



**Рис. 3.** Влияние лузиндола – антагониста М1-М2-мелатониновых рецепторов – на вызванную мелатонином синхронизацию ритма синтеза белка в разреженных суточных культурах гепатоцитов молодых крыс: *а* – контроль, разреженные культуры инкубировали 15 мин в свежей среде с 0.001%-ным ДМСО – растворителе лузиндола, отмывали, вновь инкубировали 15 мин в свежей среде с ДМСО, откуда в течение 2 ч брали пробы для измерения; *б* – после инкубации 10 мин в среде с ДМСО вносили 2 нМ мелатонина на 5 мин, затем культуры отмывали и вновь инкубировали 15 мин в свежей среде с ДМСО, откуда в течение 2 ч брали пробы; *в* – культуры инкубировали 10 мин в среде с 20 нМ лузиндола и ДМСО, куда вносили 2 нМ мелатонина на 5 мин, отмывали, вновь инкубировали 15 мин в свежей среде с 20 нМ лузиндола и ДМСО, откуда в течение 2 ч брали пробы.

ных культурах ритм синтеза белка не был обнаружен, а экзогенный мелатонин стимулировал возникновение единого ритма. На фоне антагониста рецепторов мелатонина этот гормон не инициировал ритм синтеза белка, причем сам лузиндол не изменял кинетику синтеза белка сравнительно с контролем. В обоих случаях все точки достоверно не отличались друг от друга и входили в пределы общей средней  $\pm$  ошибка. Таким образом, мелатонин стимулирует синхронизацию ритма синтеза белка в культивируемых гепатоцитах, связываясь со своими специфическими мембранными рецепторами.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Анисимов В.Н. Влияние мелатонина на процесс старения // Мелатонин в норме и патологии / Под ред. Комарова Ф.И. и др. М.: Медпрактика, 2004. С. 223–232.

Анисимов В.Н., Попович И.Г., Забежинский М.А. Влияние мелатонина на опухолевый рост // Там же. С. 255–285.

Арушанян Э.Б. Антистрессорные возможности эпифизарного мелатонина // Там же. С. 198–223.

Бродский В.Я., Нечаева Н.В., Звездина Н.Д. и др. Изменения ионов кальция и ритм синтеза белка в культуре гепатоцитов // Изв. АН. Сер. биол. 2002. № 1. С. 10–16.

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.

Бродский В.Я., Голиченков В.А., Звездина Н.Д. и др. Мелатонин усиливает синтез белка и синхронизирует ритм синтеза в культурах гепатоцитов старых крыс // Там же. 2008. Т. 39. № 6. С. 443–447.

Звездина Н.Д., Мальченко Л.А., Фатеева В.И., Бродский В.Я. Сигнальные факторы самоорганизации ритма синтеза белка в культурах гепатоцитов – ганглиозиды и катехоламины – функционируют независимо друг от друга // Там же. 2008. Т. 39. № 3. С. 198–207.

Ковальзон В.М., Вейн А.М. Мелатонин и сон // Мелатонин в норме и патологии / Под ред. Комарова Ф.И. и др. М.: Медпрактика, 2004. С. 182–198.

Малиновская Н.К., Комаров Ф.И., Рапопорт С.И. и др. Мелатонин в лечении язвенной болезни двенадцатиперстной кишки // Там же. 2004а. С. 147–163.

Малиновская Н.К., Комаров Ф.И., Рапопорт С.И. и др. Мелатонин в лечении язвенной болезни двенадцатиперстной кишки // Там же. 2004б. С. 147–163.

Sjoblom M., Safsten B., Flemstrom G. Melatonin-induced calcium signaling in clusters of human and rat duodenal enterocytes // Am. J. Physiol. 2003. V. 284. P. G1034–G1044.

## Melatonin Synchronizes Protein Synthesis Rhythm in Hepatocyte Cultures as an Agonist of Intercellular Calcium and Protein Kinases

V. Ya. Brodsky<sup>a</sup>, V. A. Golichenkov<sup>b</sup>, N. D. Zvezdina<sup>a</sup>,  
V. I. Fateeva<sup>a</sup>, and L. A. Mal'chenko<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Kol'tsov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 26, Moscow, 119334 Russia

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

e-mail:brodsky.idb@bk.ru

**Abstract**—Melatonin in nanomolar concentrations synchronizes protein synthesis in primary cultures of hepatocytes through calcium-dependent activation of protein kinases. The synchronizing effect of melatonin is blocked by the cytoplasmic calcium chelating agent BAPTA-AM (20  $\mu$ M) as well as by the inhibitor of protein kinases 1-(5-isoquinolinylsulfonyl)-5-methylpiperazine dihydrochloride (40  $\mu$ M). Thus, protein phosphorylation is the key event in hepatocyte synchronization by melatonin, as we have demonstrated previously for gangliosides and biogenic amines. The antagonist of melatonin receptors luzindole (20 nM) blocks the synchronizing function of melatonin.

**Key words:** cell–cell communication, cell self-organization, hepatocytes, melatonin, rhythm of protein synthesis, melatonin receptors.