

УДК 57.034:577.217.5+57.085.23

## МЕЛАТОНИН, ВВЕДЕННЫЙ КРЫСЕ, ЭФФЕКТИВНО СИНХРОНИЗИРУЕТ РИТМ СИНТЕЗА БЕЛКА В ПЕРВИЧНЫХ КУЛЬТУРАХ ГЕПАТОЦИТОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ЭТОЙ КРЫСЫ<sup>1</sup>

© 2010 г. В. Я. Бродский, С. И. Рапопорт\*, Т. К. Дубовая\*\*, Н. Д. Звездина,  
В. И. Фатеева, Л. А. Мальченко

*Институт биологии развития им. Кольцова РАН*

*119334 Москва, ул. Вавилова, д. 26*

*\*Московская медицинская академия им. И.М. Сеченова*

*119992 Москва, ул. Трубецкая, д. 8*

*\*\* Российский государственный медицинский университет*

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

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

Поступила в редакцию 08.04.09 г.

Окончательный вариант получен 06.08.09 г.

Мелатонин, введенный внутрибрюшинно крысе, синхронизирует околочасовой ритм синтеза белка в первичных культурах гепатоцитов, выделенных из этой крысы через 1ч 40 мин после инъекции мелатонина и изученных через 1 или 2 сут. Эффективные синхронизирующие концентрации мелатонина — 0.01–0.02 мкг/кг веса крысы — на три порядка ниже доз мелатонина, используемых в клинической практике при лечении людей.

*Ключевые слова:* межклеточные взаимодействия, мелатонин, околочасовые биоритмы, синтез белка.

Ранее мы выявили сигнальные факторы, инициирующие процессы синхронизации околочасового ритма синтеза белка, среди которых особенно выделялся мелатонин (Бродский и др., 2006, 2008, 2009; Brodsky, 2006). Эффективные дозы мелатонина были, по нашим данным, в сотни раз меньше таковых у других изученных синхронизирующих факторов. Значимость изучения механизмов действия мелатонина определяется тем, что этот гормон является антиоксидантом и антистрессорным фактором, а также влияет на продолжительность и качество сна (Анисимов, 2004; Arendt, 1995; Macchi, Bruce, 2004). Мелатонин используется в кардиологической и гастроэнтерологической клинической практике, а также для улучшения состояния здоровья старых людей (Комаров и др., 2004). В наших опытах мелатонин, введенный в наномолярных концентрациях (1–200 нМ) в среду с культурами гепатоцитов, повышал средний уровень синтеза белка и синхронизировал колебания скорости синтеза белка (Бродский и др., 2008). Будет ли проявляться синхронизирующий эффект мелатонина в условиях, приближенных к его использованию в медицине — при введении в

организм, а не в среду с клеточными культурами? Чтобы ответить на этот вопрос, мелатонин вводили молодым и старым крысам, затем выделяли гепатоциты, культивировали *in vitro* и через 1 или 2 сут исследовали в них кинетику синтеза белка.

### МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Методы культивирования гепатоцитов и исследования кинетики синтеза белка изложены ранее (Бродский и др., 2006; Brodsky et al., 2000). Основные приемы были следующими. Гепатоциты самцов крыс Вистар разного возраста изолировали с помощью коллагеназы. Изолированные гепатоциты культивировали на стеклах в бессывороточной среде 199 с добавлением альбумина (0.2 мг/мл) и инсулина (0.5 мкг/мл) (“Sigma”, США). Плотные культуры с близко расположенными клетками получали при введении в чашку Петри над стеклами, покрытыми коллагеном, суспензии изолированных гепатоцитов (около 10<sup>6</sup> клеток/мл). Разреженные культуры получали из той же суспензии клеток, разведенной примерно в 10 раз. Через 2 ч стекла с прикрепившимися клетками отмывали и оставляли в термостате еще на 1 сут, затем еще раз отмывали и начинали исследова-

<sup>1</sup> Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (проекты № 09-04-00116, 08-04-00144).

ния. В течение 2 ч последовательно через каждые 10 мин брали пробы — каждую по три культуры. В каждой культуре измеряли включение  $^3\text{H}$ -лейцина в белки за 10 мин и пул свободного меченого лейцина в той же культуре — в белковой и кислоторастворимой фракциях соответственно. Относительное включение лейцина  $I_{corr}$ , характеризующее интенсивность синтеза белка, рассчитывали по формуле:

$$I_{corr} = I_i \times P_v / P_i \text{ (импульс/мин)},$$

где  $I_i$  — включение лейцина в белки за 10 мин в одной определенной культуре;  $P_i$  — общая радиоактивность той же культуры ( $P_i = I_i + p_i$ , где  $p_i$  — пул свободного меченого лейцина в клетках той же культуры),  $P_v$  — средняя радиоактивность культур определенного опыта — среднее из  $P_i$  всех точек опыта (например, для 2-часового опыта — среднее для 36 культур). Таким образом, формула характеризует измеренное включение лейцина в белки клеток определенной культуры по отношению к доле общей радиоактивности этой культуры (включение плюс пул невключившегося меченого лейцина) к средней радиоактивности всех культур данного опыта. Поскольку величины числителя  $I_i$  и знаменателя  $P_i$  уравнения для каждой культуры зависят от одного и того же числа клеток, в формуле  $I_{corr}$  вводится поправка на число клеток в разных культурах, а также на варьирующий пул. Очевидно, что введение постоянного для каждого опыта множителя  $P_v$  не изменяет рисунка кривой, но позволяет выразить относительное включение лейцина в общепринятых единицах имп/мин, а не в процентах  $I_i$  от  $P_i$ .

Мелатонин (мелаксен) в физиологическом растворе объемом 0.5 мл вводили крысам внутрибрюшинно. Предварительно было показано, что для синхронизирующего синтез белка действия мелатонина минимальное время между инъекцией мелатонина и изоляцией гепатоцитов составляет 1 ч 40 мин, эти данные использовали в последующих опытах. Каждый опыт проводили на гепатоцитах одной и той же крысы.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследовали плотные культуры гепатоцитов с близко расположенными клетками и разреженные культуры, полученные из суспензий с разной концентрацией гепатоцитов одной и той же крысы. Как показано в десятках наших опытов (см. обзор: Brodsky, 2006), колебания интенсивности синтеза белка в плотных культурах быстро самосинхронизируются после смены среды, и в таких культурах практически сразу же после этого наблюдают окологосударственный ритм синтеза белка. В разреженных культурах клетки отстают далеко друг от друга. Многократно показано, что в разреженных культурах после смены среды ритм не выявляется в течение 2–4 ч наблюдений. Можно было ожидать, что до введения крысам мелатонина в плотных культурах ритм синтеза белка есть,

а в разреженных — нет. Однако на поведение клеток могла влиять сама инъекция раствора животному. Поэтому в качестве контроля приняли введение крысе 0.5 мл физиологического раствора, который использовали в остальных опытах для растворения мелатонина. Через 1 ч 40 мин после инъекции выделяли гепатоциты и культивировали их *in vitro*, через 1 сут культуры отмывали. В разреженных культурах в свежей среде ритма синтеза белка не выявили (рис. 1). Таким образом, сама инъекция не синхронизирует клетки; ритм синтеза белка не появляется. После добавления в среду с такими культурами 2 нМ мелатонина наблюдали ритм, т.е. такие культуры способны синхронизироваться мелатонином. В плотных культурах был обнаружен ритм синтеза, что также соответствует многим нашим наблюдениям о свойствах интактных плотных культур.

В опыте, результаты которого приведены на рис. 2, изучали влияние мелатонина, введенного внутрибрюшинно молодой крысе (вес 280 г), на кинетику синтеза белка в гепатоцитах разреженных культур. Доза мелатонина в этом случае составляла 0.012 мкг/кг веса крысы. В суточных отмывках культурах обнаружили ритм синтеза белка. Следовательно, введенный крысе мелатонин накапливается в печени и синхронизирует гепатоциты до их изоляции. Добавление в среду с такими суточными культурами мелатонина (5 нМ) не изменяло кинетику синтеза белка.

Следующие серии опытов проводили на старых (2–2.5-летних весом 550–650 г) крысах. Исследовали как разреженные, так и плотные культуры. Плотные культуры гепатоцитов интактных крыс, как показано нами ранее, самосинхронизируются вскоре после смены среды. Также ранее было показано, что амплитуда ритма в гепатоцитах старых крыс в среднем вдвое ниже, чем у молодых (Бродский и др., 2005). Амплитуду рассчитывали как разницу между максимумами и минимумами кривой в процентах от среднего уровня синтеза белка для определенного опыта. Величина амплитуды, как известно, характеризует синхронизацию колебаний скорости синтеза белка. Чем больше амплитуда ритма, тем значительнее синхронизация колебаний скорости синтеза белка (или любого другого ритма) в индивидуальных клетках. В несинхронных культурах из-за сложения максимумов и минимумов колебаний в индивидуальных клетках в сумме кинетика линейная. По нашим предыдущим данным, амплитуда ритма синтеза белка в плотных культурах интактных старых крыс, не испытывавших каких-либо внешних воздействий, была в среднем около 23%, а максимальной у единичных особей — 40% от среднего уровня синтеза белка.

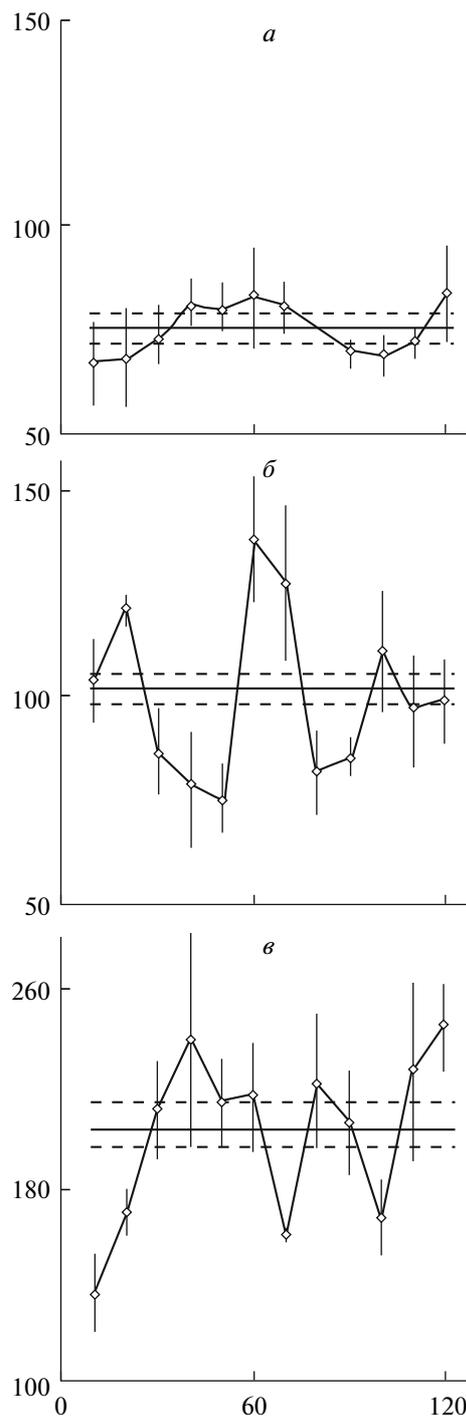
Мелатонин (0.013 мкг/кг веса крысы) вводили также старой крысе (рис. 3). Введение его (5 нМ) в среду с суточными плотными культурами не повышало средний уровень синтеза белка. Средняя амплитуда ритма синтеза белка составляла в этом слу-

чае (рис. 3) в плотных культурах около 70%, т.е. была значительно выше максимальных значений в клетках интактных старых крыс. В разреженных культурах гепатоцитов той же крысы наблюдали четкий ритм синтеза белка.

Как долго сохраняется в культуре синхронизирующий эффект мелатонина после однократного введения его крысе? Чтобы выснить это, исследовали кинетику синтеза белка через 1 и 2 сут после инъекции мелатонина (0.015 мкг/кг веса старой крысы) и культивирования гепатоцитов (рис. 4). В течение 2 сут культуры оставались синхронными, в них выявлялся ритм синтеза белка. На 2-е сут средний уровень синтеза белка был даже несколько выше, чем через 1 сут после введения мелатонина крысе. И в плотных, и в разреженных культурах наблюдали ритм синтеза белка, что характеризует кооперацию клеток в организации популяционного ритма синтеза белка. Амплитуда ритма в плотных культурах была в среднем 56%, т.е. значительно выше, чем в интактных культурах старых крыс.

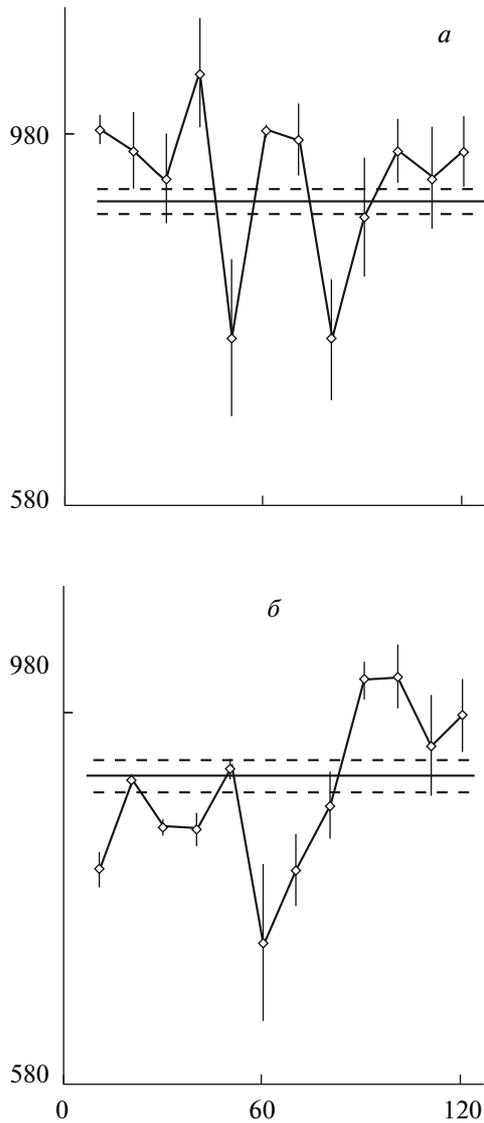
В следующих опытах выясняли: сохраняется ли синхронизирующее действие мелатонина в течение 1 сут в случае, если ввести мелатонин за 1 сут до изоляции клеток. Старой крысе вводили внутривенно мелатонин (0.015 мкг/кг), через 1 сут изолировали гепатоциты и из суспензии клеток готовили разреженные культуры. Еще через 1 сут в культурах исследовали кинетику синтеза белка. В течение 2 или 3 ч значения интенсивности синтеза в 10-минутных пробах совпали в пределах ошибок и средней линии для всего опыта. Следовательно, синхронизация колебаний синтеза белка, определяющая ритм в культурах, поставленных в первые 2 ч после введения мелатонина крысе (рис. 2–4), не сохраняется в гепатоцитах, если их выделить через 1 сут после введения мелатонина.

Любой окологоризонтальный ритм в клеточной культуре, в нашем случае ритм синтеза белка, — маркер прямых межклеточных взаимодействий (Brodsky, 1975). Синхронизация ритмов — важный процесс функционирования многих органов млекопитающих, показатель нормальных прямых межклеточных взаимодействий; нарушение таких взаимодействий приводит к включению механизмов клеточной гибели (Brodsky, 2006). Синтез сывороточных белков и ферментов детоксикации обеспечивает важнейшие функции печени, что характеризует значимость исследований кинетики синтеза белка в гепатоцитах. В наших опытах для синхронизации ритма синтеза белка в гепатоцитах использовали внутривенное введение 0.01–0.02 мкг мелатонина (мелаксена) на кг веса крысы. При лечении различных болезней в медицинской практике используют капсулы мелаксена в дозе 3 мг, т.е. примерно 0.03–0.05 мг на кг веса человека (Комаров и др., 2004), даже если принимать одну капсулу в сутки. При всей условности сравнения внутривенного и перорального введения препарата с последующим заведомо разным



**Рис. 1.** Внутривенное введение крысе весом 500 г 0.5 мл физиологического раствора, выделение гепатоцитов через 1 ч 40 мин и культивирование их на стеклах, покрытых коллагеном; исследование отмытых суточных культур: *a* — разреженных в чистой среде; *b* — тех же с введенным на 5 мин 2 нМ мелатонином; *v* — плотных в чистой среде.

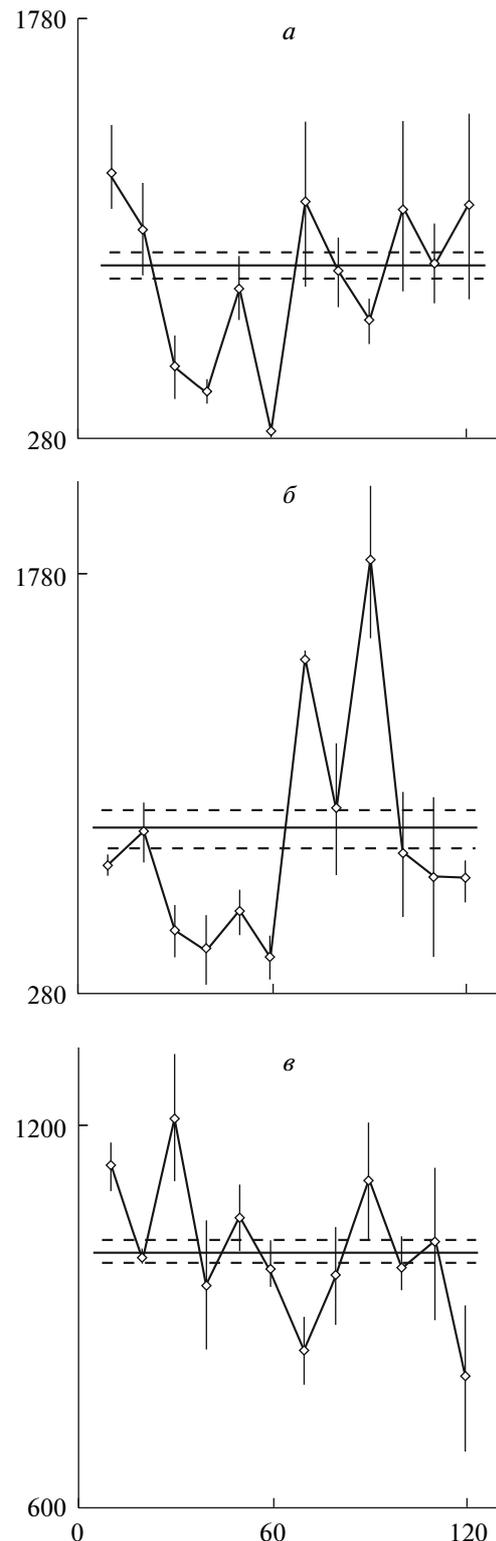
Здесь и на рис. 2–4: по оси абсцисс — время, мин; по оси ординат — относительное включение лейцина в белки с поправкой на пул свободного лейцина ( $I_{corr}$  имп/мин); в каждой точке времени изучали три культуры; точка — среднее  $\pm$  ошибка; (—) — средний уровень синтеза белка для данной кривой, (---) — ошибка этой средней.



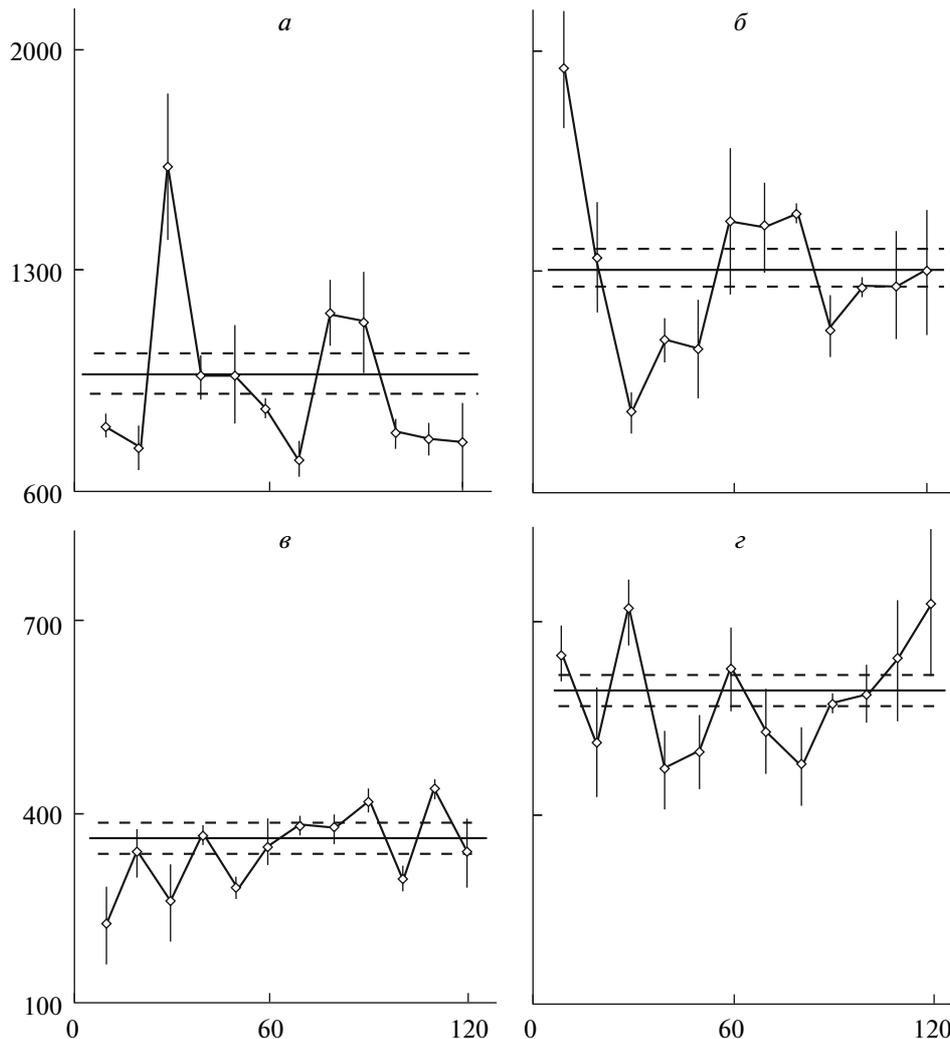
**Рис. 2.** Внутривентриальное введение крысе в возрасте 3 мес весом 280 г мелатонина (0.012 мкг/кг веса), выделение гепатоцитов через 1 ч 40 мин и исследование разреженных отмытых суточных культур: *а* – в чистой среде; *б* – в среде таких же культур с введенным на 5 мин 5 нМ мелатонином.

накоплением препарата в печени, а также при недостатках сравнения действия мелатонина на крысу и человека, разница доз в тысячи раз явно превышает некорректность сравнения. В опытах на крысах и мышках (Комаров и др., 2004) до сих пор использовали мелатонин в дозе 1–2 мг/кг веса крысы или мыши, т.е. еще большие дозы, чем при лечении человека. Кажется целесообразным снижение доз мелатонина, используемых в клинической практике, особенно в целях профилактики или в качестве снотворного.

Мелатонин, как известно, является агонистом (стимулятором) внутриклеточного кальция (Sjoblom et al., 2003). Изучение сигнальной (в организации



**Рис. 3.** Внутривентриальное введение крысе в возрасте 24 мес и весом 550 г мелатонина (0.013 мкг/кг), выделение гепатоцитов через 1 ч 40 мин и исследование отмытых суточных культур: *а* – плотных в чистой среде; *б* – таких же с введенным на 5 мин 5 нМ мелатонином; *в* – разреженных из той же суспензии изолированных гепатоцитов.



**Рис. 4.** Внутривенное введение старой крысе весом 620 г мелатонина (0.015 мкг/кг веса), выделение гепатоцитов через 1 ч 40 мин и исследование отмытых через 1 и 2 сут культур: а, б – 1- и 2-суточные разреженные культуры; в, г – 1- и 2-суточные плотные культуры.

ритма синтеза белка) функции мелатонина открывает возможность анализа механизмов действия других препаратов – агонистов кальция. Ранее в опытах со стимуляторами и ингибиторами кальция и протеинкиназ мы установили следующую цепь процессов, приводящих к самоорганизации колебаний интенсивности синтеза белка и формированию суммарного ритма в популяции клеток: сигнальные факторы (в первых опытах это были ганглиозиды и фенилэфрин) → увеличение концентрации ионов кальция в цитоплазме → активация протеинкиназ → фосфорилирование белков → сдвиг фаз ритма синтеза белка → суммарный ритм синтеза белка (Бродский и др., 2006). Из лекарственных средств так действовал фенилэфрин, производное норадrenalина (Звездина и др., 2008). В наших последних исследованиях показан такой же механизм организующего ритма синтеза белка мелатонина. Блокада с помощью ВАРТА-АМ изменений кон-

центрации цитоплазматического кальция или торможение активности протеинкиназ специфическими ингибиторами снимают синхронизирующее действие мелатонина (Бродский и др., 2009).

Исследования эффектов мелатонина чрезвычайно перспективны, особенно в связи с их использованием в медицинской практике.

#### 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.* 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.
- Бродский В.Я., Голиченков В.А., Звездина Н.Д. и др. Мелатонин синхронизирует ритм синтеза белка в культурах гепатоцитов как агонист внутриклеточного кальция и протеинкиназ // Там же. 2009. Т. 40. № 3. С. 231–236.
- 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 // Там же. 2008. Т. 39. № 3. С. 198–207.
- Комаров Ф.И., Рапопорт С.И., Малиновская Н.А., Анисимов В.Н. Мелатонин в норме и патологии. М.: Медпрактика, 2004. 368 с.
- Arendt J. Melatonin and the mammalian pineal gland. L.: Chapman and Hall., 1995. 332 p.
- Brodsky V.Y. Protein synthesis rhythm // J. Theor. Biol. 1975. V. 55. P. 397–407.
- 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 Philosop. Soc. 2006. V. 81. P. 143–162.
- Brodsky V.Y., Nechaeva N.V., Zvezdina N.D. et al. Ganglioside-mediated synchronization of the protein synthesis activity in cultured hepatocytes // Cell Biol. Internat. 2000. V. 24. P. 211–222.
- Macchi M.M., Bruce J.M. Human pineal physiology and functional significance of melatonin // Frontiers Neuroendocrinol. 2004. V. 25. P. 177–195.
- 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.

## Melatonin Injected into Rat Efficiently Synchronizes the Rhythm of Protein Synthesis in Primary Hepatocyte Cultures Isolated from This Rat

V. Y. Brodsky<sup>a</sup>, S. I. Rapoport<sup>b</sup>, T. K. Dubovaya<sup>c</sup>, N. D. Zvezdina<sup>a</sup>,  
V. I. Fateeva<sup>a</sup>, and L. A. Malchenko<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Koltzov Institute of Developmental Biology, ul. Vavilova 26, Moscow, 119334 Russia

<sup>b</sup> Sechenov Moscow Medical Academy, ul. Trubetskaya 8/2, Moscow, 119992 Russia

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

e-mail: brodsky.idb@bk.ru

**Abstract**—Melatonin injected intraperitoneally into rat synchronizes the ultradian rhythm of protein synthesis after 100 min in primary hepatocyte cultures isolated from this rat, which are studied after 1 or 2 days. The effective synchronization concentrations of melatonin—0.01–0.02 µg per kg of rat weight—are three orders lower than melatonin doses used in clinical practice in human treatment.

**Key words:** intercellular interactions, melatonin, ultradian biorhythms, protein synthesis