DOI: 10.31016/978-5-9902341-5-4.2020.21.157-163
УДК 591.6; 576; 577.17; 57.05

МЕЛАТОНИН МОДУЛИРУЕТ ДИНАМИКУ ПРОЛИФЕРАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ПЛАНАРИЙ

Крещенко Н. Д. [1],
кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник

Скавуляк А. Н. [1],
аспирант

Бондаренко С. М. [2],
аспирант

Ермаков А. М. [3],
кандидат биологических наук, старший научный сотрудник

Аннотация

Мелатонин является производным биогенного амина серотонина, обнаруженного во всех классах организмов, включая плоских червей. Мелатонин проявляет разнообразные физиологические функции, основная из которых – роль регулятора циркадных ритмов. Мелатонин через специфические G-протеин связанные рецепторы непосредственно воздействует на клетки, изменяя уровень секреции других гормонов. На ранних стадиях эмбрионального развития биогенные амины, в том числе мелатонин, играют роль специализированных клеточных сигнальных молекул, которые регулируют процессы клеточного обновления. В настоящей работе исследовали регуляторную роль мелатонина, используя в качестве объекта свободноживущих плоских червей, планарий *Schmidtea mediterranea*. Изучали влияние мелатонина на суточную динамику пролиферативной активности стволовых клеток планарий с помощью иммуноцитохимического метода и конфокальной лазерной сканирующей микроскопии. Для иммуноцитохимической идентификации пролиферирующих клеток применяли антитела к H3 фосфогистонам. Установлено, что под действием мелатонина (1 μM) уменьшалось общее число пролиферирующих клеток в теле планарий. Кроме того, мелатонин из-

[1] Институт биофизики клетки ФИЦ ПНЦБИ РАН (142290, Московская область, г. Пущино, ул. Институтская, 3), nkreshch@rambler.ru

[2] Национальный исследовательский Томский Государственный Университет (634050, г. Томск, пр-т Ленина, 34а)

[3] Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН (142290, Московская обл., г. Пущино, ул. Институтская, 3)

менял динамику суточной пролиферативной активности у планарий – сглаживая ритмические колебания, наблюдаемые в контрольной группе особей. Для выяснения механизмов действия мелатонина необходимы дальнейшие исследования.

Ключевые слова: планарии, мелатонин, пролиферация, стволовые клетки.

MELATONIN MODULATES DYNAMICS OF PLANARIAN STEM CELL PROLIFERATION

Kreshchenko N. D. [1],
Candidate of Biological Sciences, Leading Researcher

Skavulyak A. N. [1],
Postgraduate student

Bondarenko S. M. [2],
Postgraduate student

Ermakov A. M. [3],
Candidate of Biological Sciences, Senior Researcher

Abstract

Melatonin is a derivate of biogenic amine of serotonin identified in all classes of animals including flatworms. Melatonin demonstrates different physiological functions the main of which is circadian rhythm regulation. Via specific G-protein coupled receptors, melatonin affects the target cells changing the levels of other hormones. On early stages of embryonic development, biogenic amines as well as melatonin play a role of specific signal cell molecules that regulate processes of cellular renewal. This work has studied physiological function of melatonin in free-living flatworms, planarian *Schmidtea mediterranea*. The influence of melatonin on diurnal dynamics of stem cells proliferation was investigated using an immunocytochemical method and confocal laser scanning microscopy. The specific antibodies against H3 phosphohistones were applied for immunocytochemical identification of proliferative cells. It was shown that melatonin (1 μM) decreased the total number of proliferative cells in planarians. It was also found that the diurnal dynamics of cells proliferation in planarians

[1] Institute of Cell Biophysics of the Russian Academy of Sciences (3, Institutskaya st., Pushchino, Moscow Region, 142290), nkreshch@rambler.ru

[2] National Research Tomsk State University (34a, Lenina prospect, Tomsk, 634050)

[3] Institute of Theoretical and Experimental Biophysics of the Russian Academy of Sciences (3, Institutskaya st., Pushchino, Moscow Region, 142290)

was changed by melatonin: regular rhythmic oscillations observed in the control group of animals were smoothening. Further researches are required to clarify mechanisms of melatonin actions.

Keywords: planarian, melatonin, proliferation, stem cells.

Введение. Мелатонин – гормон с разнообразными физиологическими функциями. Он идентифицирован во всех таксонах живых организмов: у бактерий, растений и животных. Продукция мелатонина в организме зависит от длины светового дня, и многие животные используют её как «сезонные часы». Мелатонин может регулировать функции, зависящие от фотопериода – размножение, миграционное поведение, сезонную линьку. Мелатонин является производным биогенного амина серотонина, обнаруженного во всех классах организмов, включая плоских червей. В эпифизарных клетках человека серотонин с помощью ферментов N-ацетилтрансферазы и гидроксииндол-О-метилтрансферазы превращается в мелатонин. Существуют отрывочные сведения и об участии мелатонина в процессе регенерации у планарий (Ермакова и др., 2009). В настоящей работе свободноживущих плоских червей, планарий *Schmidtea mediterranea* использовали в качестве биологического объекта для выявления возможной роли мелатонина в регуляции суточной динамики пролиферативной активности стволовых клеток в организме интактных (не регенерирующих) особей.

Материалы и методы. Планарий *Schmidtea mediterranea* (Platyhelminthes, Turbellaria) содержали в затемненных условиях в смеси водопроводной и дистиллированной воды (2:1) при 20±1 °С, кормили один раз в неделю. За 7 дней до опыта кормление прекращали. Отбирали животных длиной 4–5 мм. Контрольная и подопытная группы планарий находились в условиях постоянного затемнения в течение 3 сут, на 4-е сут определяли уровень митотической активности в теле животных. Для этого каждые 2 ч отбирали по 12 особей и фиксировали. Для выявления пролиферирующих клеток применяли иммуногистохимический метод с использованием первичных антител на фосфорилированный гистон 3 (Abcam) и вторичных антител с флуоресцентным зондом CF488A (Biotium). Готовые тотальные препараты (рис. 1а, 1б) анализировали с помощью флуоресцентного Leica DM6000B и конфокального лазерного сканирующего Leica TCS SP5 (Leica, Германия) микроскопов (оборудование Сектора Оптической микроскопии и спектрофотометрии ЦКП ПНЦБИ РАН, Пущино). Полученные изображения обрабатывали программой ImageJ

(NIH, США), производили подсчет митотических клеток. Определяли число митозов на 1 мм^2 площади тела животного, усредняли данное значение по 12 измерениям в каждой из 12 точек наблюдения. Площадь планарии измеряли с помощью программы Axio Image (Carl Zeiss, Германия). В одной серии опыта в подопытной и контрольной группах было исследовано по 144 особей. Опыты проводили методом слепого контроля и повторяли дважды. Статистическую обработку результатов проводили с помощью Т-критерия Стьюдента.

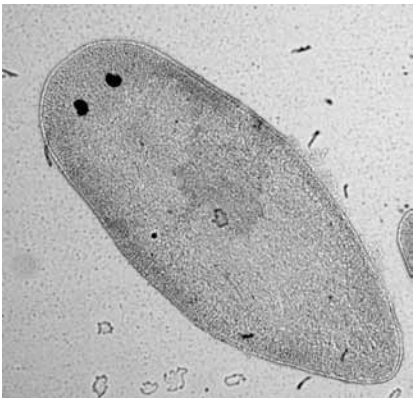

Рис. 1а. Планария *Schmidtea mediterranea*, тотальный препарат, световая микроскопия, головной конец тела – верхний левый угол, черные точки – глаза (фоторецепторы)

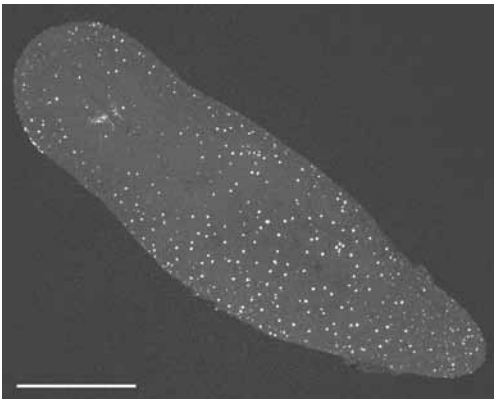

Рис. 1б. Окраска митотических клеток в теле планарии (светлые точки, окраска анти-Н3-фосфогистонами), тотальный препарат, конфокальная лазерная сканирующая микроскопия, масштаб 1 мм

Результаты исследований. При подсчете митотических клеток в течение суток в контрольной группе животных наблюдали ритмические колебания пролиферативной активности стволовых клеток (см. рис. 1а, 1б). Распределение митотической активности имело многовершинный характер. Колебания происходили как в светлое, так и в темное время суток. Максимумы значений (138–153 клеток) были отмечены в 0, 4, 10, 16, и 20 часов местного времени, а минимумы (108–127 клеток) наблюдались в 2, 6, 12, 18 и 22 ч (рис. 1в).

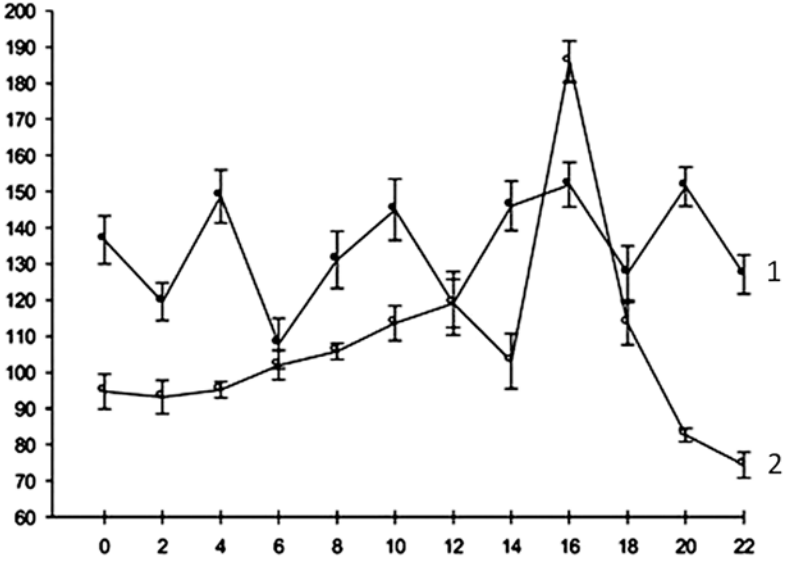

Рис. 1в. Суточная динамика пролиферации клеток планарий:
черные кружочки (1) – контроль, открытые кружочки (2) – опыт;
по оси ординат – среднее значение митозов ± стандартное отклонение;
по оси абсцисс – местное время, часы

В то время как в контрольной группе животных наблюдали ритмические колебания суточной митотической активности с периодом колебаний 4–6 ч, в подопытной группе с мелатонином в концентрации 1μM распределение пролиферирующих клеток оказалось другим. Добавление мелатонина изменяло динамику суточной пролиферативной активности в теле планарий *S. mediterranea* – сглаживая ритмические колебания, характерные для особей контрольной группы. С 0 ч до 12 ч наблюдали плато (см. рис. 1в), когда число пролиферирующих

клеток практически не колебалось или очень плавно повышалось (95–115 клеток). В темное время суток, с 20 ч вечера до 8 ч утра, пролиферативная активность клеток в подопытной группе была существенно ниже, чем в контрольной, абсолютный минимум наблюдали в 20–22 ч (75–82 клетки). В светлое время суток, в период между 14 и 18 ч, наблюдали ярко выраженный пик в районе 16 ч (185 клеток). После чего число митозов резко уменьшалось. Оказалось также, что общее (суммарное) за сутки число митозов у животных, находящихся под воздействием мелатонина, составило 81% от уровня контрольных животных. Таким образом, мелатонин снижает общий уровень пролиферации у планарий (оказывая определенное влияние на деление клеток?), а также изменяет динамику пролиферативной активности, сглаживая колебательный суточный ритм делений стволовых клеток планарий (проявляя, скорее, анти-ритмогенный, чем ритмогенный эффект?). Полученные данные могут свидетельствовать об участии гормона в регуляции циркадных ритмов у этих организмов.

Обсуждение. В основе организации биосистем лежит ритмичность их функционирования. Суточные биоритмы обусловливают механизмы адаптации регуляторных систем живых организмов к 24-часовому циклу. Частным проявлением периодической деятельности биосистем является процесс репродукции клеток, который лежит в основе жизненно важных морфогенетических процессов таких, как рост и развитие, поддержание постоянства клеточного состава тканей. Установлено, что мелатонин может подавлять клеточную пролиферацию у млекопитающих. В ряде исследований на лабораторных животных и в системах культур опухолевых тканей было обнаружено, что мелатонин обладает антиопухолевым, онкостатическим действием (Кветная и др., 2005). Однако вопрос мелатониновой регуляции биоритмов пролиферации до сих пор является дискуссионным. В настоящей работе было показано, что планарии, плоские черви с ярко выраженной регенерационной способностью и наличием в их теле плюрипотентных стволовых клеток, могут быть использованы в качестве модельного объекта при изучении регуляции пролиферативной активности клеток. Оказалось, что у планарий, как и у высших организмов, мелатонин снижал общий уровень пролиферативной активности клеток. Одновременно он также сглаживал ее внутрисуточные ритмические колебания, наблюдаемые у контрольных животных, которые не подвергались воздействию мелатонина. Таким образом, мелатонин у планарий оказывал определенное влияние на пролиферативную активность клеток, сходное с тем, которое наблюдали у высших животных. Это свидетельствует о том, что даже у таких прос-

тых организмов, как плоские черви, присутствует система восприятия и регуляции биоритмов, схожая с таковой у млекопитающих. Механизмы наблюдаемых эффектов требуют дальнейшего изучения.

Работа выполнена при частичной поддержке гранта РФФИ 18-04-00349а.

Литература

1. *Ермакова О.Н., Ермаков А.М., Тирас Х.П., Леднев В.В.* Эффект мелатонина на регенерацию планарий *Girardia tigrina* // Онтогенез. 2009. Т. 40. С. 466–469.
2. *Кветная Т.В.* и др. Мелатонин – нейроиммуноэндокринный маркер возрастной патологии. 2005. 144 с.

References

1. *Ermakova O.N.*, et al. Melatonin effect on the planarian *Girardia tigrina* regeneration. *Ontogenez*. 2009; (40):466–469. (In Russ.)
2. *Kvetnaya T.V.*, et al. Melatonin is a neuro-immune-endocrine marker of age pathology. 2005. 144 p. (In Russ.)