

УДК 612.43

## РОЛЬ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ЭПИФИЗА В РЕГУЛЯЦИИ ЦИРКАДИАННОГО РИТМА ПРОЛИФЕРАЦИИ ЭПИТЕЛИЯ ПИЩЕВОДА

С.М. Слесарев, В.И. Арав, Е.В. Слесарева, В.В. Шестаков,  
А.В. Снежкина, А.С. Салманская

*Ульяновский государственный университет*

Суточная динамика пролиферации эпителия пищевода белых крыс характеризуется циркадианной ритмичностью. Митотическая активность эпителия пищевода синхронизирована с суточным свето-темновым циклом. Активная фаза ритма пролиферации отмечается в дневные часы. Эпифизэктомия вызывает исчезновение циркадианного ритма пролиферации эпителия пищевода белых крыс. Введение пептидов эпифиза приводит к восстановлению циркадианного ритма пролиферации эпителия пищевода белых крыс.

**Ключевые слова:** циркадианный ритм, пролиферация, эпифизэктомия, пептиды эпифиза, мелатонин.

**Введение.** В основе организации живых систем лежит ритмичность их функционирования. Являясь фундаментальным свойством живой материи, биоритмы проявляются на всех уровнях ее организации. В зависимости от продолжительности периода колебания ритмы организма подразделяют на высокочастотные ритмы (период колебаний менее 0,5 ч), ритмы со средней частотой колебания или ультрадианнные (период 0,5–20 ч), циркадианнные (период 20–28 ч), инфрадианнные (период 28–60 ч), а также низкочастотные ритмы с периодом колебаний более 2,5 суток [3]. Среда существования организма подвержена периодическим изменениям, которые задают ритм активности нервной и эндокринной систем, что формирует ритм остальных функций организма, в том числе ритмичность функционирования пролиферативных систем различных тканей и органов. Из всех факторов внешней среды стабильно во времени изменяется только продолжительность светового дня. Поэтому циркадианнные ритмы организма синхронизированы с продолжительностью фотопериода.

Непосредственное участие в синхронизации функций организма с фотопериодом принимает эпифиз [2], который трансформирует нервный импульсный ответ на световой раздражитель в эндокринный сигнал. В настоящее время ритмогенную функцию эпифиза связывают с продукцией мелатонина [8], син-

тез и секреция которого имеет циркадианный характер [9]. Помимо мелатонина, эпифиз продуцирует комплекс биологически активных пептидов, ритмогенная роль которых до сих пор оставалась неизученной. Показана возможность формирования циркадианного ритма пролиферации эпителия крипт тощей кишки эпифизэктомированных белых крыс путем совместного введения мелатонина и пептидов эпифиза [7].

**Цель исследования** – изучение непосредственного вклада биологически активных пептидов эпифиза и мелатонина в регуляцию циркадианного ритма пролиферации эпителия пищевода.

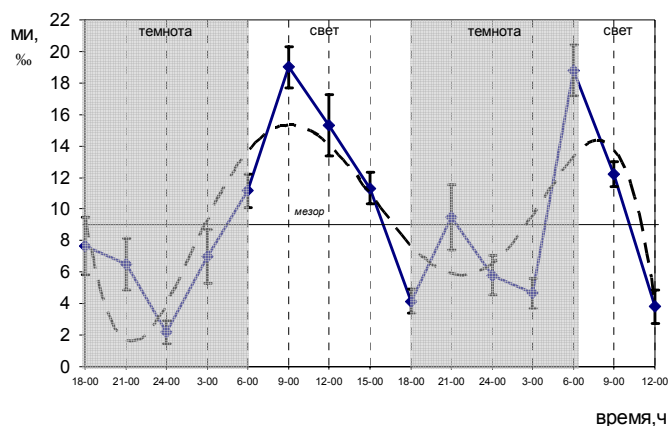
**Материалы и методы.** Опыты выполнены на 360 самцах беспородных белых крыс массой 170–200 г. Животных в течение двадцати дней адаптировали к режиму освещения – 12 ч свет : 12 ч темнота (свет с 6<sup>00</sup> до 18<sup>00</sup>). Доступ к пище и воде был свободным. Животных разделили на четыре экспериментальные группы: интактные контрольные, эпифизэктомированные, эпифизэктомированные с последующей инъекцией мелатонина и эпифизэктомированные с последующей инъекцией уксуснокислого экстракта пептидов эпифиза – эпипаламина. По истечении адаптационного периода к режиму освещения была произведена эпифизэктомия путем резекции участка теменной кости с подлежащим эпифизом [1]. Начиная с 27-го дня после

эпифизэктомии, части эпифизэктомированных животных в течение двух недель ежедневно во время смены световой фазы суток на темновую ( $18^{00}$ ) вводили внутривентриально эпителиамин в дозе 2,5 мг/кг и мелатонин в дозе 10 мг/кг. Выведение животных из эксперимента проводили на 40-й день после эпифизэктомии под эфирным наркозом в течение двух суток с интервалом в три часа с соблюдением правил проведения работ с использованием экспериментальных животных.

С целью выявления регуляторного влияния биологически активных веществ эпифиза на формирование циркадианного ритма пролиферации эпителия пищевода определяли суточную динамику митотического индекса (МИ) клеток указанной ткани. Контролем служили группы интактных и эпифизэктомированных животных. Пищевод фиксировали в течение 1 часа в жидкости Карнуа, обезжировали в спиртах и заключали в парафин. Поперечные срезы пищевода толщиной 5–6 мкм окрашивали гематоксилин-эозином. Окрашенные срезы заключали в канадский бальзам. Учет количества делящихся клеток производили в базальном и шиповатом слоях эпителия. Статистическую обработку резуль-

татов проводили с использованием метода Фишера–Стьюдента. Выявление циркадианного и ультрадианного ритмов пролиферации, а также определение их периодов осуществлялось методом спектрального анализа значений МИ.

**Результаты и обсуждение.** Спектральный анализ значений МИ эпителия пищевода интактных животных показал наличие циркадианного (период 21,5 ч) и ультрадианного (период 9,5 ч) ритмов пролиферации. Активная фаза циркадианного ритма пролиферации приходилась на последние ночные и преимущественно дневные часы (рис. 1). Акрофаза ритма отмечалась в 9 ч первых суток и 6 ч вторых суток эксперимента, достоверно превышая минимальные значения МИ в 24 ч (первые сутки) и в 12 ч (вторые сутки) соответственно ( $p < 0,001$ ). Митотическая активность эпителия пищевода в световой фазе фотопериода ( $12,3 \pm 2,5\%$ ) превышала ( $p < 0,05$ ) таковую в темновой фазе ( $5,9 \pm 1\%$ ). Приведенные данные свидетельствуют о том, что динамика МИ эпителия пищевода интактных животных имеет характер монофазного суточного ритма, скоррелированного с режимом освещения.



**Рис. 1.** Динамика МИ эпителия пищевода интактных контрольных беспородных белых крыс: — МИ; --- сглаженная кривая

Эпифизэктомия привела к исчезновению циркадианного ритма МИ эпителия пищевода. Результаты спектрального анализа показали отсутствие циркадианного ритма МИ. В то же время обнаружился выраженный ультрадианный ритм с периодом около 11 ч. Колебания МИ эпителия пищевода эпифи-

эктомированных животных на протяжении двух суток не имели какой-либо связи с фоторежимом (рис. 2). На общем монотонном фоне изменений МИ наблюдалось четыре статистически достоверных подъема ( $p < 0,05$ ) с максимумами митотической активности в 24 и 12 ч (первые сутки), а также в 21 и 9 ч

(вторые сутки). Уровень пролиферации эпителия пищевода эпифизэктомированных животных был таким же, как у интактных ( $p > 0,05$ ). Среднесуточные значения МИ интактных и эпифизэктомированных животных составили  $9,27 \pm 1,36 \%$  и  $8,45 \pm 0,97 \%$  соответственно. Пролиферативная активность в световой ( $9,85 \pm 1,7 \%$ ) и темновой

( $9,2 \pm 1,75 \%$ ) фазах фотопериода не имела статистически достоверных ( $p > 0,05$ ) отличий. Таким образом, удаление эпифиза привело к исчезновению циркадианного ритма пролиферации на 40-е сутки после эпифизэктомии. У эпифизэктомированных животных динамика МИ характеризуется только ультрадианной ритмичностью.

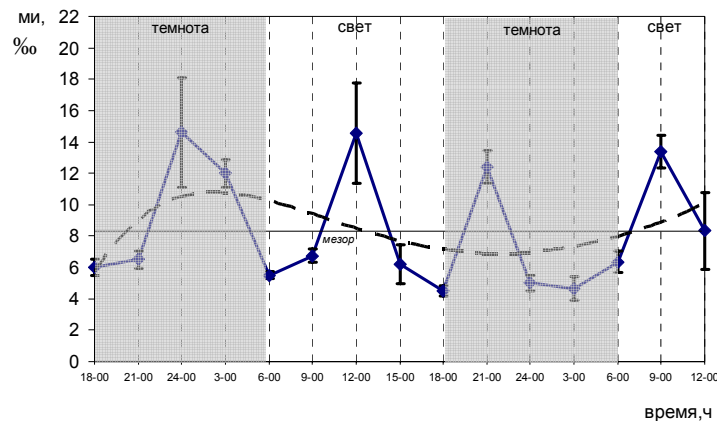


Рис. 2. Динамика МИ эпителия пищевода беспородных белых крыс после эпифизэктомии:

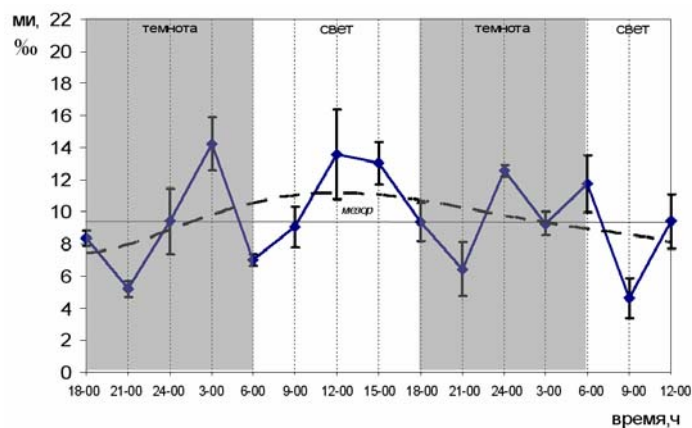
— МИ;  
--- сглаженная кривая

Результаты проведенного исследования указывают на отсутствие ритмогенного эффекта мелатонина при его разовом в течение суток введении эпифизэктомированным животным (10 мг/кг, 18 часов, 14 дней). Суточная динамика пролиферации эпителиев пищевода характеризовалась только ультрадианными колебаниями с периодом около 12 часов. На отсутствие циркадианного ритма пролиферации эпителия пищевода эпифизэктомированных животных, которым вводили мелатонин, указывает характер сглаженной кривой динамики МИ (рис. 3). По отношению к сглаженной кривой динамики МИ эпителия пищевода интактных животных (рис. 1) на протяжении двух суток она утратила вид синусоиды. Увеличение митотической активности ( $p < 0,05$ ) приходилось как на темновой, так и световой периоды, что указывает на отсутствие синхронизации колебаний митотической активности с суточным светотемновым циклом. Среднесуточное значение МИ составило  $9,5 \pm 0,77 \%$ , а суточный пул делящихся клеток —  $71,64 \pm 34 \%$ . Оба показателя существенно не отличались ( $p > 0,05$ ) от

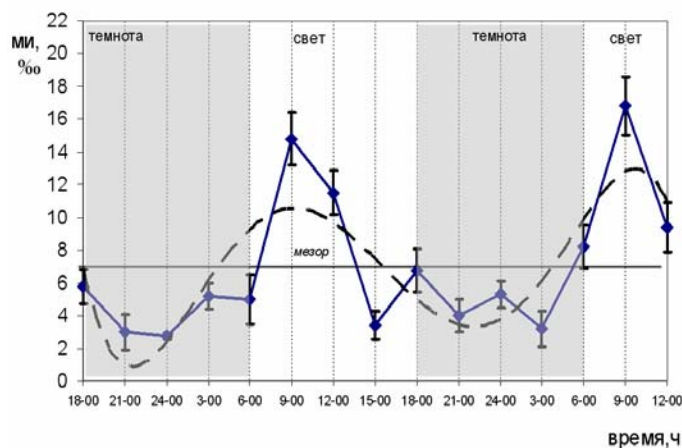
значений соответствующих показателей интактных и эпифизэктомированных животных.

Введение пептидов эпифиза эпифизэктомированным животным привело к формированию циркадианного ритма пролиферации эпителия пищевода. Методом спектрального анализа были выявлены две составляющие ритма МИ: циркадианный (период 21,5 ч) и ультрадианный с периодом около 9 ч.

Циркадианный ритм МИ эпифизэктомированных животных после введения пептидов эпифиза имел характер монофазного ритма с максимумом деления клеток в 9 ч как в течение первых, так и вторых суток опыта и минимумом в 24 ч первых и в 3 ч вторых суток ( $p < 0,001$ ). Возрастание митотической активности происходило в последние ночные и преимущественно дневные часы на протяжении как первых, так и вторых суток (рис. 4). Длительность активной фазы ритма восстановилась до уровня близкого к показателям животных контрольной группы. Акрофаза ритма наблюдалась в 9 ч как первых, так и вторых суток опыта. Смещение акрофазы на 3 ч наблюдалось только во вторые сутки эксперимента.



**Рис. 3.** Динамика МИ эпителия пищевода эпифизэктомированных беспородных белых крыс после введения мелатонина:  
— МИ;  
--- сглаженная кривая



**Рис. 4.** Динамика МИ эпителия пищевода эпифизэктомированных беспородных белых крыс после введения пептидов эпифиза:  
— МИ;  
--- сглаженная кривая

Особенности биоритмологического процесса обнаружили сходство с таковыми у интактных животных, что подтверждается также характером сглаженной кривой (рис. 1, 3). У эпифизэктомированных животных, которым вводили пептиды эпифиза, среднесуточное значение МИ не имело статистически достоверных отличий ( $p > 0,05$ ) от значения соответствующего показателя интактных и эпифизэктомированных животных. В то же время динамика МИ, в отличие от эпифизэктомированных животных, характеризовалась наличием циркадианного ритма. Доля клеток, делящихся в световой фазе фотопериода ( $11,2 \pm 2,3$  %), достоверно ( $p < 0,05$ ) превышала таковую в темновой фазе ( $3,9 \pm 0,45$  %).

**Заключение.** Таким образом, формирование циркадианного ритма пролиферации

эпителия пищевода осуществляется при участии эпифиза. Это подтверждается исчезновением циркадианного ритма МИ после эпифизэктомии и его восстановлением в результате введения эпифизэктомированным животным пептидов эпифиза. Эпифиз продуцирует биологически активные вещества двух типов – индоламина (мелатонин и серотонин) и олигопептиды, взаимодействие которых в организме до настоящего времени является дискуссионным вопросом. В нашем опыте введение мелатонина эпифизэктомированным животным производилось непосредственно перед сменой фоторежима со световой фазы на темновую, что должно было смоделировать ночной подъем уровня мелатонина у интактных животных. Заслуживает внимания тот факт, что действие мелато-

нина зависит не только от уровня гормона в крови, но и от продолжительности его секреции в течение ночи. Вероятно, однократное в течение суток введение мелатонина не позволило установить достаточный уровень концентрации гормона в крови вследствие его быстрого выведения, что и объясняет отсутствие эффекта мелатонина на формирование циркадианного ритма пролиферации.

Методом хроматографии из пинеальной железы выделено 25 пептидных комплексов [5]. Изучению свойств отдельных эпифизарных пептидных компонентов посвящены единичные работы, указывающие на важную роль биологически активных пептидов эпифиза в реализации функций железы. Некоторые фракции эпифизарных пептидов оказываются физиологически чрезвычайно активными, превосходя эффект мелатонина в десятки раз [6]. Предполагается, что ритмогенные свойства пептидов эпифиза могут быть связаны с их способностью формировать ритм продукции мелатонина [4]. Однако восстановление циркадианного ритма пролиферации в результате введения пептидов эпифиза эпифизэктомизированным животным указывает на то, что ритмогенными свойствами обладают непосредственно пептиды эпифиза. Роль биологически активных пептидов эпифиза в организме изучена недостаточно. Во многом это обусловлено тем, что до настоящего времени не идентифицировано большинство полипептидных продуктов железы.

1. Арав В.И. Метод экстирпации эпифиза у белых крыс / В.И. Арав, С.М. Слесарев, Е.В. Слесарева // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2008. – № 9. – С. 385–387.

2. Арушанян, Э.Б. Комплексное взаимодействие супрахиазматических ядер гипоталамуса с эпифизом и полосатым телом – функционально единая система регуляции суточных колебаний поведения / Э.Б. Арушанян // Журн. высш. нервн. деят. – 1996. – № 1. – С. 15–22.

3. Дедов, И.И. Биоритмы гормонов / И.И. Дедов, В.И. Дедов. – М.: Медицина, 1992. – 256 с.

4. Влияние пептидного препарата эпифиза на суточный ритм мелатонинобразующей функции эпифиза у людей пожилого возраста / О.В. Коркушко [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2004. – Т. 137, № 8. – С. 228–229.

5. Кузник, Б.И. Цитомедины и их роль в регуляции физиологических функций / Б.И. Кузник, В.Г. Морозов, В.Х. Хавинсон // Успехи современ. биол. – 1995. – № 3. – С. 360–367.

6. Семичева, Т.В. Эпифиз – современные данные о физиологии и патологии / Т.В. Семичева, А.Ю. Гарибашвили // Пробл. эндокринологии. – 2000. – № 4. – С. 38–44.

7. Слесарев С.М. Эпифизарная регуляция временной организации пролиферации эпителия крипты тощей кишки у белых крыс / С.М. Слесарев, А.И. Антохин, В.И. Арав // Вестник РГМУ. – 2008. – № 6. – С. 86–88.

8. Entrainment of locomotor activity rhythm in pinealectomized adult Syrian hamsters by daily melatonin infusion / S. Schuhler [et al.] // Behav. Brain. Res. – 2002. – Vol. 133, № 2. – P. 343–350.

9. Gunduz, B. Daily rhythm in serum melatonin and leptin levels in the Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*) / B. Gunduz // Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol. – 2002. – Vol. 132, № 2. – P. 393–401.

## EFFECT OF POLYPEPTIDE PINEAL EXTRACT AND MELATONIN ON THE CIRCADIAN RHYTHM OF PROLIFERATION OF THE GULLET EPITHELIUM

S.M. Slesarev, V.I. Arav, E.V. Slesareva

*Ulyanovsk State University*

The diurnal dynamics of proliferation of the gullet epithelium in albino rats have a circadian rhythm. The mitotic activity of the gullet epithelium have a synchronization with diurnal light-dark cycle. The active phase of proliferation observe in the day time. Pinealectomy is cause the disappearance the circadian rhythm of proliferation of the gullet epithelium in albino rats. Injecting of melatonin didn't render of rhythmogen effect. Pineal polypeptide treatment restored the circadian rhythm proliferation of the gullet epithelium in albino rats.

**Key words:** circadian rhythm, proliferation, pinealectomy, pineal polypeptide, melatonin.