

ИНФРАДИАННЫЕ РИТМЫ МИТОТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ЭПИТЕЛИЯ ПИЩЕВОДА И УРОВНЯ КОРТИКОСТЕРОНА И ТИРОКСИНА У ЯПОНСКИХ ПЕРЕПЕЛОВ *COTURNIX JAPONICA*

© М. Е. Диатроптов

*Научно-исследовательский институт морфологии человека РАМН, Москва;
электронный адрес: diatrom@inbox.ru*

На протяжении 16 сут ежесуточно исследовали динамику уровня кортикостерона и тироксина в сыворотке крови, а также пролиферативную активность эпителия пищевода у самцов японских перепелов. Выявили 4-суточный ритм уровня кортикостерона, синхронно проявляющийся у разных особей. В динамике уровня тироксина обнаружили 3-суточный биоритм. Показатели митотического индекса в эпителии пищевода отрицательно коррелируют с уровнем кортикостерона. Инфрадианные ритмы уровня кортикостерона, тироксина и митотического индекса эпителия пищевода необходимо учитывать при планировании и проведении экспериментов, связанных с определением уровня этих гормонов и митотической активности эпителиальных тканей.

Ключевые слова: инфрадианный ритм, кортикостерон, тироксин, пролиферация, эпителий, птица.

В последние годы внимание исследователей все чаще стало привлекать изучение инфрадианных биоритмов у экспериментальных животных и человека (Рапопорт и др., 2012). Выявление инфрадианных ритмов митотической активности эпителиальных тканей может служить предпосылкой для разработки хронобиологических подходов к лечению заболеваний, обусловленных нарушением пролиферативной активности эпителия.

Регуляция пролиферативной активности эпителиальных тканей находится под контролем нейроиммунноэндокринной системы. Важными и хорошо изученными регуляторами и синхронизаторами митотической активности клеток в организме являются глюкокортикоидные и тиреоидные гормоны. Глюкокортикоидные гормоны усиливают дифференцировку клеток и одновременно подавляют их способность к делению. Гормоны щитовидной железы стимулируют клеточные деления (Алов, 1964; Бабаева, 2009).

Немногочисленные исследования инфрадианных ритмов уровня глюкокортикоидных гормонов у млекопитающих указывают на существование приблизительно 4-суточного ритма (Ермакова, 2002; Maschke et al., 2003; Jozsa et al., 2005b). Обнаружен 4-суточный ритм уровня глюкокортикоидных гормонов и тестостерона, синхронно проявляющийся у крыс Вистар и человека. Акрофаза 4-суточного ритма на протяжении года скачкообразно переходит на 1 сут вперед каждые 69—73 сут (Диатроптов, 2011а, 2011б). Вопрос об универсальном характере инфрадианных биоритмов остается открытым. В литературе отсутствуют исследования инфрадианных ритмов глюкокортикоидных гормонов у птиц, эволюционно разошедшихся с классом млекопитающих около 310 млн лет назад (Kumar, Hedges, 1998), однако имею-

щих сходные физиологические механизмы эндокринной регуляции.

Таким образом, целью настоящего исследования было определение инфрадианных ритмов уровня кортикостерона и тироксина в сыворотке крови и митотической активности эпителия пищевода у самцов перепелов.

Материал и методика

Работа выполнена на 200 половозрелых самцах японского перепела в возрасте 2.5—3 мес. При работе с экспериментальными животными руководствовались приказом Минздрава СССР № 755 от 12.08.1977 г. На проведение эксперимента получено разрешение биоэтической комиссии ФГБУ НИИ морфологии человека РАМН. Птиц содержали при естественном освещении и комнатной температуре. Животных выводили из эксперимента по 7 особей ежедневно в период с 26 июля по 16 августа 2012 г. в 21 ч по местному солнечному времени (Москва). По литературным данным, у птиц, проявляющих дневную форму активности, максимальный уровень митотической активности эпителиальных тканей регистрируется в вечерние и ночные часы (Horseman, Nollin, 1985).

Объектом исследования митотической активности, согласно сложившейся традиции, служил эпителий пищевода или роговицы, который быстро обновляется и характеризуется высокой интенсивностью пролиферации (Романов и др., 1996, 2002).

Фрагмент средней части пищевода фиксировали в жидкости Карнуа в течение 2 ч, затем переносили в 70%-ный этиловый спирт. Далее препараты проводили через спирты восходящей концентрации и заливали в па-

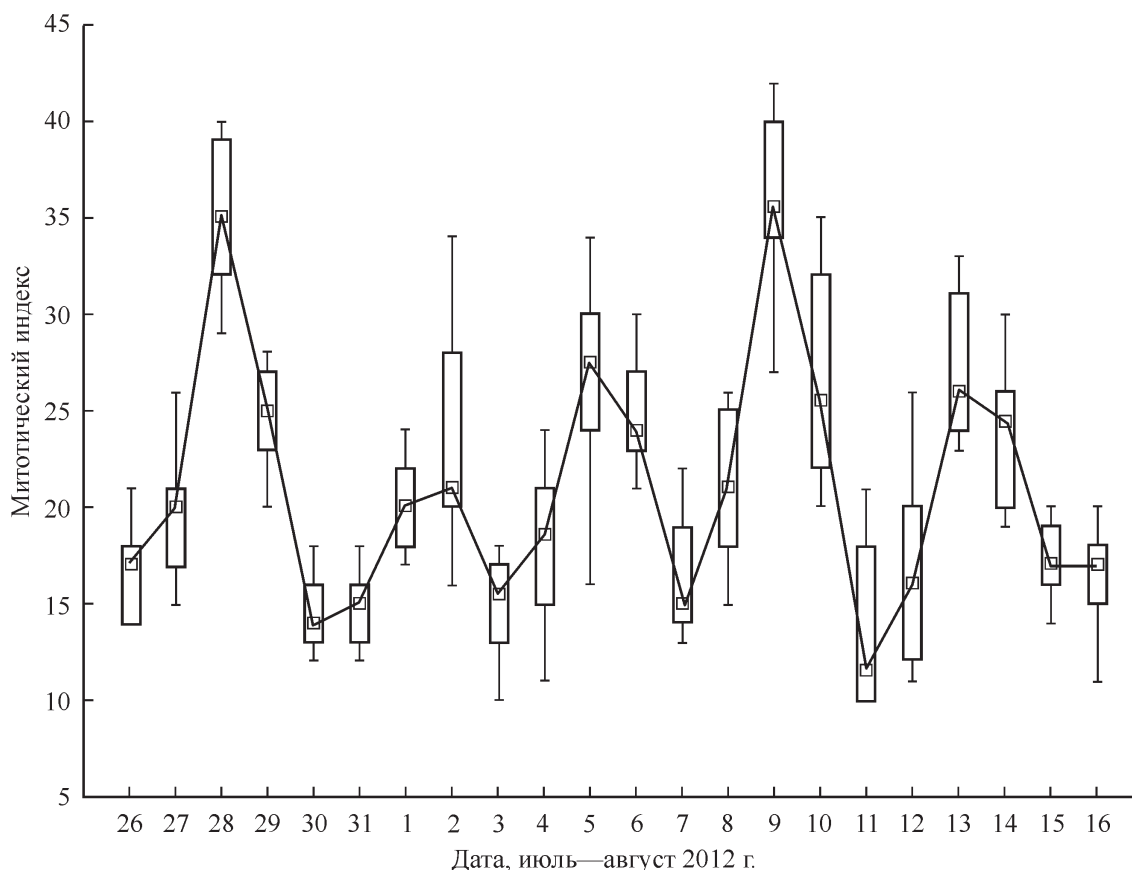


Рис. 1. Динамика уровня митотической активности эпителия пищевода у самцов японских перепелов в период с 26 июля по 16 августа 2012 г.

По вертикали — митотический индекс (число митозов на 1000 клеток). Здесь и на рис. 2 малый квадрат означает медиану, прямоугольник — диапазон от нижнего до верхнего квартилей, вертикальные отрезки — разброс значений. Достоверность различий между значениями разных дат: $P(26-28) = 0.009$, $P(28-30) = 0.006$, $P(30-1) = 0.008$, $P(1-3) = 0.01$, $P(3-5) = 0.013$, $P(5-7) = 0.01$, $P(7-9) = 0.01$, $P(9-11) = 0.004$, $P(11-13) = 0.004$, $P(13-15) = 0.003$.

рафин. Изготавливали гистологические срезы толщиной 5 мкм, окрашивали их гематоксилином и эозином. Число митозов в гистологических срезах пищевода определяли, просматривая 5000 эпителиальных клеток и используя объектив с увеличением 40 \times . Забор крови из вены голени проводили у отдельной группы перепелов ($n = 9$) ежедневно с 1 по 16 августа 2012 г. в 8 ч утра, когда уровень глюкокортикоидных гормонов максимален (Jong et al., 2001; Henshaw et al., 2009). Длительность процедуры забора крови не превышала 3 мин. Ежедневный забор крови в объеме около 100 мкл не приводил к значительному снижению гематокрита. Образцы сывороток хранили не более 1 мес при -20°C .

Уровень тироксина и кортикостерона в сыворотке крови определяли ИФА-наборами реактивов от компании Cusabio biotech Co., LTD и Monobind Inc. соответственно. Для регистрации результата использовали микропланшетный ИФА-анализатор ANTHOS 2010 (Австрия).

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием программы Statistica 6.0. Анализ полученных цифровых данных по критерию Колмогорова—Смирнова показал, что они не подчиняются законам нормального распределения, вследствие чего были выбраны методы непараметрической статистики. Достоверность различий между показателями определяли по U -критерию Манна-Уитни. Различия считали статистически значимыми при $P < 0.05$.

Результаты и обсуждение

В период с 26 июля по 16 августа 2012 г. в динамике митотической активности эпителия пищевода выявлен 4-суточный период (рис. 1). Показатели митотического индекса в акрофазе и батифазе 4-суточного биоритма различались. Минимальные значения митотического индекса отмечали 26, 30—31 июля, 3, 7, 11, 15 и 16 августа, максимальные — 28 июля, 1—2, 5—6, 9 и 13—14 августа.

Динамика уровня кортикостерона в сыворотке крови у всех особей имела ритм с периодом в 4 сут, проявляющийся синфазно, что позволило обобщить данные и представить результаты по группе (рис. 2, а). В дни, когда уровень кортикостерона был максимально высоким, наблюдались минимальные показатели митотической активности эпителия пищевода в вечернее время. Коэффициент корреляции (r) между показателями уровня кортикостерона и митотического индекса составил -0.67 ($p < 0.004$).

Известно, что глюкокортикоидные гормоны оказывают системные эффекты, в том числе они влияют на пролиферативную активность эпителиальных тканей, усиливая процессы дифференцировки клеток и одновременно подавляя их способность к делению. В работе, проведенной на мышах, показано, что на фоне повышенного уровня кортикостерона наблюдается снижение митотической

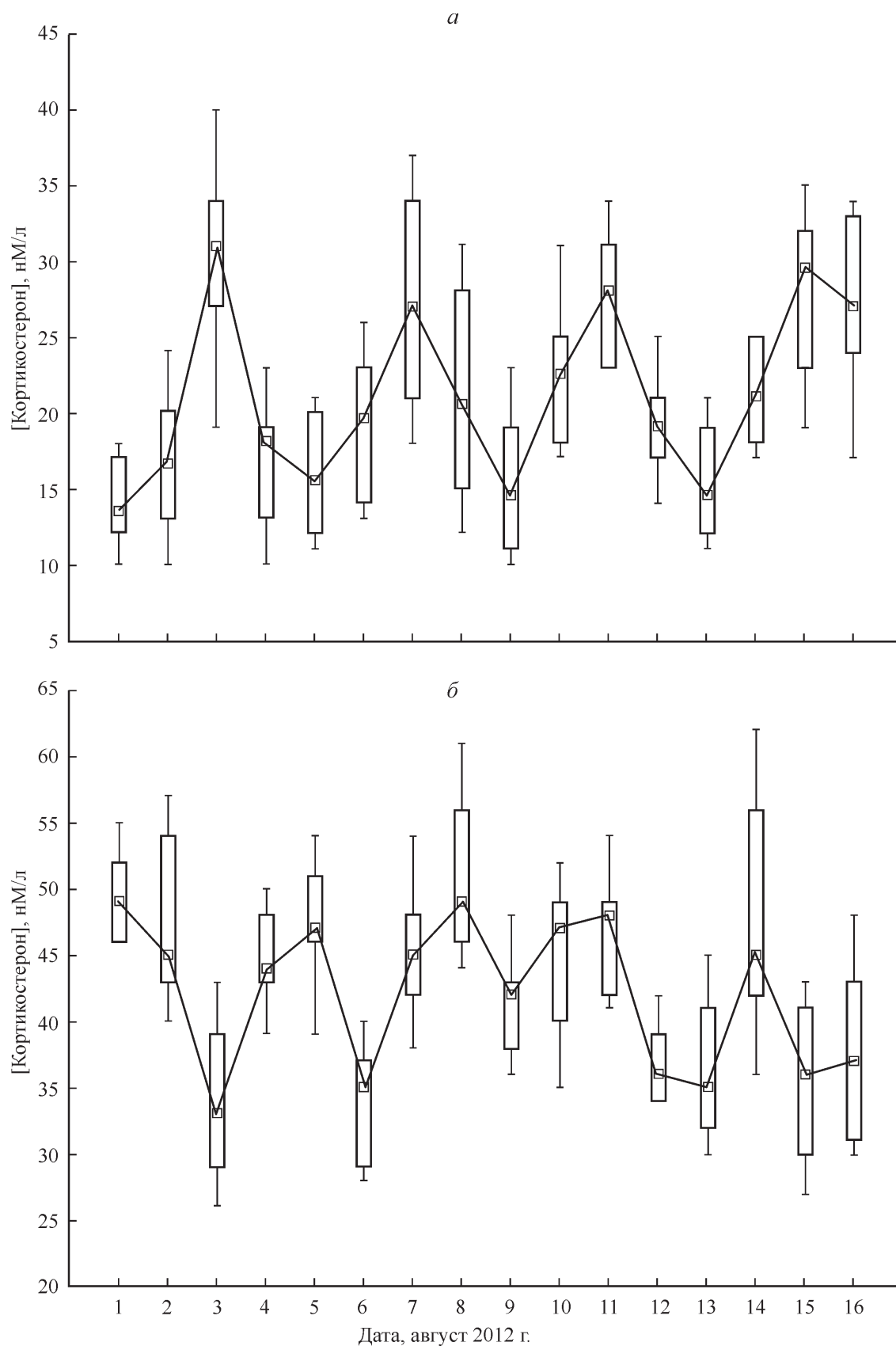


Рис. 2. Динамика уровня кортикостерона (а) и тироксина (б) в сыворотке крови у самцов японских перепелов в период с 1 по 16 августа 2012 г.

Достоверность различий между значениями разных дат: а — $P(1-3) = 0.004$, $P(3-5) = 0.01$, $P(5-7) = 0.013$, $P(7-9) = 0.016$, $P(9-11) = 0.006$, $P(11-13) = 0.004$, $P(13-15) = 0.008$; б — $P(1-3) = 0.009$, $P(3-5) = 0.02$, $P(5-6) = 0.016$, $P(6-8) = 0.009$, $P(8-9) = 0.009$, $P(11-12) = 0.01$, $P(12-14) = 0.046$.

активности эпителия пищевода и роговицы (Scheving et al., 1983)

В динамике уровня тироксина в сыворотке крови перепелов был выявлен биоритм с периодом, равным 3 сут. Максимальные значения уровня тироксина наблюдались 1—2, 5, 7—8, 10—11 и 14 августа, а минимальные — 3, 6, 12—13 и 15 августа. Динамика индивидуальных колебаний уровня тироксина у разных особей была достаточно синхронной, чтобы можно было представить полученные данные в виде графика, усредненного по группе (рис. 2, б).

Гормоны щитовидной железы также участвуют в синхронизации ритмов пролиферации клеток, стимулируя клеточные деления (Романов, Блохина, 1971). При воздействиях, приводящих к повышению функциональной активности щитовидной железы, у экспериментальных животных наблюдалось значительное (2-кратное) увеличение пролиферации эпителия в различных органах (Алов, 1964).

Наиболее выраженные максимумы пролиферативной активности 28 июля и 9 августа можно объяснить различиями динамики уровня глюкокортикоидных и тиреоидных гормонов. В эти дни отмечался низкий уровень кортикостерона на фоне предшествующего высокого уровня тироксина.

Таким образом, у самцов японских перепелов выявлен 4-суточный ритм уровня кортикостерона, синхронно проявляющийся у разных особей. В динамике уровня общего и свободного тироксина установлен 3-суточный биоритм. Митотический индекс в эпителии пищевода отрицательно коррелировал с уровнем кортикостерона.

В настоящее время остается актуальным вопрос исследования синхронизаторов биологических ритмов различной природы. Такими синхронизирующими факторами внешней среды, как колебания освещенности и температуры, не всегда удается объяснить многие периодические явления в физиологии живых организмов. Было показано (Jozsa et al., 2005b), что секреция кортикостерона у крыс имеет инфрадианный ритм с периодом, равным приблизительно 4 сут, синхронно проявляющийся у разных особей. Механизм этой синхронизации неизвестен. Ряд авторов указывают на факт синхронизации биоритмов гелиогеофизическими факторами, такими как вариации солнечной активности, геомагнитные возмущения, флуктуации атмосферного инфразвука, интенсивности нейтронов у поверхности земли и т. д. (Владимирский и др., 1995; Белишева и др., 2005; Мартынюк, Темуриянц, 2009).

Показано, что геомагнитные бури вызывают снижение выработки мелатонина в эпифизе, увеличение его содержания в гипоталамусе, а также увеличение разброса по группе показателей уровня кортикостерона в сыворотке крови (Jozsa et al., 2005a). В настоящей работе достоверной корреляции между исследованными показателями и Ар-индексом, характеризующим геомагнитную обстановку, не выявлено. Мелатонин и глюкокортикоиды являются основными гормонами, участвующими в реакции организма на изменения окружающей среды (Перцов, 2011).

Синхронность инфрадианных ритмов уровня глюкокортикоидных и тиреоидных гормонов и митотической активности эпителия пищевода у разных особей одного вида и у разных классов живых организмов (с учетом формы суточной активности) указывает на внешнюю природу синхронизирующего фактора. Выявленные нами

4-суточный ритм уровня кортикостерона и 3-суточный ритм тиреоидных гормонов, а также связанный с ними уровень митотической активности эпителиальных тканей у млекопитающих и птиц следует учитывать при проведении экспериментов и разработке хронобиологических подходов в медицине.

Список литературы

- Алов И. А. 1964. Очерки физиологии митотического деления клеток. М.: Медицина. 302 с.
- Бабаева А. Г. 2009. Регенерация: факты и перспективы. М.: Изд-во РАМН. 336 с.
- Белишева Н. К., Кузевский Б. М., Вашенюк Э. В., Жиров В. К. 2005. Связь динамики слияния клеток, растущих *in vitro*, с вариациями интенсивности нейтронов у поверхности земли. Докл. РАН. 402 (6) : 831—834.
- Владимирский Б. М., Нарманский В. Я., Темуриянц Н. А. 1995. Глобальная ритмика солнечной системы в земной среде обитания. Биофизика. 40 (4) : 749—754.
- Диатроптов М. Е. 2011а. Инфрадианные колебания уровня тестостерона в сыворотке крови лабораторных крыс-самцов. Бюл. эксперим. биол. мед. 151 (5) : 577—580.
- Диатроптов М. Е. 2011б. Инфрадианный ритм изменения уровня стероидных гормонов и рецепторного антагониста интерлейкина—1 у мужчин зрелого возраста. Иммунология. 32 (6) : 324—327.
- Ермакова И. В. 2002. Изменение глюкокортикоидной функции надпочечников у мальчиков-первоклассников в период адаптации к началу обучения в школе и в течение учебного года. Физиология человека. 28 (1) : 35—41.
- Мартынюк В. С., Темуриянц Н. А. 2009. Магнитные поля крайне низкой частоты как фактор модуляции и синхронизации инфрадианных биоритмов у животных. Геофизические процессы и биосфера. 8 (1) : 36—50.
- Перцов С. С. 2011. Мелатонин в системных механизмах эмоционального стресса. М.: Изд-во РАМН. 232 с.
- Рапопорт С. И., Фролов В. А., Хетагурова Л. Г. 2012. Хронобиология и хрономедицина: Руководство. М.: ООО Медицинское информационное агентство. 480 с.
- Романов Ю. А., Блохина А. Н. 1971. Изменение под влиянием тироксина действия адреналина на деление клеток. Бюл. эксперим. биол. мед. 72 (9) : 94—97.
- Романов Ю. А., Евстафьев В. В., Рыбаков В. П., Ириков О. А. 2002. Околочасовые биологические ритмы размножения клеток. Бюл. эксперим. биол. мед. 134 (7) : 97—100.
- Романов Ю. А., Ириков О. А., Филиппович С. С., Евстафьев В. В. 1996. Влияние инверсии фоторежима на разнопериодические биологические ритмы митотического индекса в эпителии пищевода мышей. Бюл. эксперим. биол. мед. 121 (1) : 94—97.
- Henshaw I., Fransson T., Jakobsson S., Jenni-Eiermann S., Kullberg C. 2009. Information from the geomagnetic field triggers a reduced adrenocortical response in a migratory bird. J. Exp. Biol. 212 : 2902—2907.
- Horseman N. D., Nollin L. J. 1985. The mitogenic, but not differentiative, response of crop tissue to prolactin is circadian phase dependent. Endocrinology. 116 : 2085—2089.
- Jong I. C., Voorst A. S., Erkens J. H., Ehlhardt D. A., Blokhuis H. J. 2001. Determination of the circadian rhythm in plasma corticosterone and catecholamine concentrations in growing broiler breeders using intravenous cannulation. Physiol. Behav. 74 : 299—304.
- Jozsa R., Halberg F., Cornelissen G., Zeman M., Kazsaki J., Csernus V., Katinas G. S., Wendt H. W., Schwartzkopff O., Stebelova K., Dulkova K., Chibisov S. M., Engebretson M., Pan W., Bubenik G. A., Nagy G., Herold M., Hardeland R., Huther G., Poggele B., Tarquini R., Perfetto F., Salti R., Olah A., Csokas N., Delmore P., Otsuka K., Bakken E. E., Allen J., Amory-Mazaudin C. 2005a. Chronomics, neuroendocrine feedsidedwards and the recor-

ding and consulting of nowcasts-forecasts of geomagnetics. Biomed. Pharmacother. 59 : 24—30.

Jozsa R., Olah A., Cornelissen G., Csernus V., Otsuka K., Zeman M., Nagy G., Kaszaki J., Stebelova K., Csokas N., Pan W., Herold M., Bakken E. E., Halberg F. 2005b. Circadian and extracircadian exploration during daytime hours of circulating corticosterone and other endocrine chronomes. Biomed. Pharmacother. 59 : 109—116.

Kumar S., Hedges S. B. 1998. A molecular timescale for vertebrate evolution. Nature. 392 : 917—920.

Maschke C., Harder J., Cornelissen G., Hecht K., Otsuka K., Halberg F. 2003. Chronoeoepidemiology of «strain»: infradian chronomics of urinary cortisol and catecholamines during nightly exposure to noise. Biomed. Pharmacother. 57 : 126—135.

Scheving L. E., Tsai T. H., Powell E. W., Pasley J. N., Halberg F., Dunn J. 1983. Bilateral lesions of suprachiasmatic nuclei affect circadian rhythms in [3H]-thymidine incorporation into deoxyribonucleic acid in mouse intestinal tract, mitotic index of corneal epithelium, and serum corticosterone. Anat. Rec. 205 : 239—249.

Поступила 4 X 2012

INFRADIAN RHYTHMS OF THE ESOPHAGEAL EPITHELIUM MITOTIC ACTIVITY
AND CORTICOSTERONE AND THYROXIN LEVELS IN JAPANESE QUAILS *COTURNIX JAPONICA*

M. E. Diatropov

Scientific Research Institute of Human Morphology RAMS, Moscow;
e-mail: diatrom@inbox.ru

An everyday investigation of the dynamics of the blood serum corticosterone and thyroxin levels, as well as the esophageal epithelium proliferation activity of male Japanese quails has been conducted over the period of 16 days. A 4-day rhythm of the corticosterone serum level occurring synchronically in the bodies of different individuals was discovered. A 3-day biorhythm of the thyroxin level was shown. The mitotic index figures in the esophageal epithelium negatively correlated with the corticosterone level. The revealed infradian rhythms of the thyroxin corticosterone and thyroxin levels as well as those of the esophageal epithelium mitotic index should not be overlooked while planning and carrying out the experiments concerning the determination of the level of these hormones and the mitotic activity of epithelial tissues.

Key words: infradian rhythms, corticosterone, thyroxin, proliferation, epithelium, bird.