

САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

На правах рукописи

Сибаров  
Дмитрий Александрович

**Пептидная секреция в эпифизе крыс в дневное время**

03.00.13 – физиология

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Санкт-Петербург  
2001

Работа выполнена на кафедре общей физиологии Санкт-Петербургского государственного университета

Научный руководитель  
академик РАН А.Д.Ноздрачев

Официальные оппоненты — доктор медицинских наук В.Г.Морозов  
доктор биологических наук Ю.А.Толкунов

Ведущее учреждение — Институт эволюционной физиологии  
и биохимии им. И.М.Сеченова РАН

Защита состоится « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2001 г. в 16 часов  
на заседании диссертационного совета Д212.232.10 по защите диссертаций на  
соискание ученой степени доктора биологических наук в Санкт-Петербургском  
государственном университете по адресу:  
199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7/9, ауд. 90.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке им. А.М.Горького  
Санкт-Петербургского государственного университета.

Автореферат разослан « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2001 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета  
доктор биологических наук,  
профессор

Н.П. Алексеев

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Эпифиз (пинеальная или шишковидная железа) – фотонейроэндокринный орган позвоночных животных, осуществляющий сезонную и суточную модуляцию деятельности репродуктивной системы (Mess et al., 1978; Коваленко, 1993), участвует в формировании реакций организма на стрессорные воздействия и является важным компонентом иммуноэндокринных взаимодействий (Milin J.R., 1974, 1981, 1984; Champney T.H., 1985; Арушанян и др. 1993). Активность эпифиза находится в строгой зависимости от освещенности окружающей среды, воспринимаемой сетчаткой глаза, а также подвержена сезонным колебаниям.

Гормонам эпифиза посвящено огромное количество научных публикаций, однако большинство из них касается мелатонина, максимум секреции которого наблюдается в темное время суток. В литературе преобладает мнение, что эпифиз активно секретирует гормоны только ночью, а в светлое время его активность незначительна. Если судить только по мелатонину, то такая точка зрения могла бы быть справедливой, однако эпифиз секретирует в кровь также и другие вещества, особый интерес из которых, в силу их высокой биологической активности, представляют пептиды. Пептидным гормонам эпифиза, по сравнению с мелатонином, посвящено непропорционально мало работ. Чрезвычайно скудные сведения и о циркадной ритмике их секреции. Именно поэтому весьма актуально изучение секреторных процессов в эпифизе в светлое время суток, когда метаболическая активность пинеалоцитов, связанная с синтезом индоламинов (мелатонина) невелика, и любые изменения секреции других гормонов, таких как пептидные, выходят на первый план.

Эпифиз наряду с гипоталамо-гипофизарным комплексом вовлекается в формирование множественных адаптационных ответов организма на стрессорное воздействие, главным образом, за счет влияний со стороны верхнего шейного симпатического ганглия и ЦНС в I фазу общего адаптационного синдрома и за счет действия гормонов коры надпочечников во II его фазу (Арушанян и др., 1993). Показано, что под влиянием страха, шума, вибрации, иммобилизации, гипергликемии, отсадки потомства у лактирующих животных, принудительного купания в холодной воде, а также множества других экстремальных воздействий усиливается продукция эпифизом мелатонина и веществ пептидной природы (Анисимов, 1997). Многие из свойств гормонов эпифиза проявляются только при стрессе и выражаются в противодействии вызываемым им патологическим изменениям. Вероятно именно поэтому удаление эпифиза мало сказывается на жизнеспособности организма, но только до тех пор, пока последний не подвергается какому-либо стрессорному воздействию. На основании этих данных выдвигалось предположение, что эпифиз обеспечивает нормализацию гомеостаза при стрессе, а в норме его регуляторные влияния на организм невелики (Арушанян и др., 1993).

Изучение закономерностей секреции в эпифизе имеет бесспорную теоретическую ценность для понимания механизмов стресс-лимитирующих реакций, а также практическую значимость при разработке медицинских препаратов, повышающих адаптационные возможности организма и оказывающих геропротекторное действие. К сожалению, в настоящее время только для мелатонина в определенной степени исследованы этапы синтеза, регуляция секреции и физиологическая роль. Данные о других гормонах железы и их значение в организме более редки и противоречивы. Несмотря на важнейшую роль эпифиза в регуляции иммунных, стрессорных и других процессов, его пептидные гормоны, а в особенности их секреция в дневное время и при действии экстремальных факторов изучены чрезвычайно слабо.

Среди факторов, влияющих на активность клеток эпифиза, наиболее известно воздействие со стороны сетчатки глаза, осуществляемое через краниальный шейный симпатический ганглий, главным образом, в темное время суток. В то же время,

контроль со стороны обонятельной системы, которая у грызунов поставляет мозгу даже больше информации, чем зрительная, гораздо менее исследован. Уникальное положение и химическая связь обонятельной системы одновременно с окружающей средой и с ЦНС делают ее удобным путем неинвазивного воздействия на деятельность мозга. Несмотря на богатый спектр работ по влиянию на эпифиз зрительной системы, имеются лишь единичные обрывочные сведения о его связях с обонятельными структурами. В то же время, для физиологии и медицины выяснение механизмов регуляции и саморегуляции пептидной секреции в эпифизе имеет большую теоретическую и практическую ценность.

**Цель и задачи исследования** Основной **целью** настоящего исследования стало изучение белково-пептидной секреции в пинеалоцитах крыс в светлое время суток в обычных условиях и при действии таких экстремальных факторов, как осмотический стресс и опухоль толстой кишки. В связи с этим, были сформулированы следующие **задачи**:

1. анализ структурно-функциональных изменений в паренхиме эпифиза у крыс, подвергавшихся 48-часовой водной и пищевой депривации с использованием световой, электронной и флуоресцентной микроскопии;
2. исследование влияния осмотического стресса на содержание в эпифизе суммарной полипептидной фракции, вазопрессина, окситоцина, аргинин-вазотоцина, серотонина и мелатонина методом высокоэффективной жидкостной хроматографии;
3. электрофизиологическое исследование спонтанной электрической активности пинеалоцитов у животных в обычном состоянии и в условиях осмотического и онкогенного стресса, а также проверка сопряжения этой активности с экзоцитозом гормонов;
4. оценка функциональной активности пинеалоцитов *in situ* и *in vitro* при аппликациях окситоцина, эпиталона, эпиталамина, вилона, норадреналина и антагонистов  $\alpha$ - и  $\beta$ -адренорецепторов;
5. изучение влияния интраназальных введений пептидных препаратов и электростимуляции обонятельного эпителия на структурно-функциональную организацию паренхимы эпифиза, электрическую активность пинеалоцитов и содержание в них продукта генов раннего стрессорного ответа белка C-Fos.

**Научная новизна работы.** Получены новые данные о структурных изменениях и особенностях функционирования эпифиза в условиях осмотического и онкогенного стресса. Впервые показана связь электрической активности пинеалоцитов с экзоцитозом секреторных везикул и возможность влияния пептидов эпифиза на их секрецию в железе. Впервые обнаружены межклеточные взаимодействия пинеалоцитов как механизм активации секреторной активности эпифиза при стрессе. Получены новые сведения о регуляторных влияниях на эпифиз со стороны обонятельного сенсорного входа и продемонстрирована перспективность метода интраназальных введений пептидных препаратов для коррекции функций железы.

**Основные положения, выносимые на защиту:**

- не только в ночное, но и в дневное время эпифиз активно вовлекается в реализацию общего адаптационного синдрома при длительном хроническом стрессе, усиливая продукцию веществ белково-пептидной природы, но тормозя, в то же время, секрецию мелатонина;
- секреция пептидного материала сопряжена с уровнем электрической активности пинеалоцитов; при усилении секреции более активные клетки могут стимулировать разряды соседних клеток за счет межклеточных контактов;

- принципиальное отличие физиологических реакций эпифиза на адренергическую стимуляцию в обычных условиях от таковых при осмотическом и онкогенном стрессе;
- пептидные вещества эпифиза при интраназальном введении и прямой аппликации оказывают тормозное воздействие на электрическую активность некоторых популяций пинеалоцитов.

Научно-практическая значимость работы. Полученные в работе новые данные об особенностях пептидной секреции в эпифизе в светлое время суток существенно расширяют представления о путях активации функций эпифиза при хронических видах стресса, о механизмах саморегуляции железы и о возможных неинвазивных способах коррекции состояния эпифиза. Полученные данные могут быть использованы при исследованиях в области физиологии стресса, эндокринологии, электрофизиологии нейросекреторных органов и барьерной функции ЦНС. Материалы диссертации могут быть использованы в преподавании соответствующих дисциплин в биологических и медицинских ВУЗах. Сведения о существовании пути проникновения крупных пептидных молекул из носовой полости в эпифиз могут быть полезны для разработки медицинских методов коррекции работы железы. Разработанная методика анализа записей спонтанной электрической мультиклеточной активности может применяться для других нейроэндокринных структур.

Апробация работы. Основные положения диссертации доложены и обсуждены на: Всероссийской конференции "Человек и его здоровье", (С.-Петербург, 1998); 27th Gottingen Neurobiology Conference, (Gottingen, Germany, 1999); Всероссийской конференции «Нейроэндокринология-2000» (С.-Петербург, 2000); Federation of European Neuroscience Societies (Millenium meeting), (Brighton, U.K, 2000); Regional ISPNE Congress (С.-Петербург, 2001); Заседании Всероссийского Физиологического общества им И.П.Павлова (С.-Петербург, 2000, 2001).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 18 работ (5 статей, 13 тезисов).

Структура и объем работы. Диссертация содержит введение, обзор литературы, методы исследований, результаты исследований и их обсуждение, заключение, выводы и список цитируемой литературы. Работа изложена на 180 страницах машинописного текста, содержит 1 таблицу и 50 рисунков. Библиографический указатель состоит из 220 источников.

## ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования служили белые лабораторные крысы линии Wistar, весом 160-180г, содержащиеся в стандартных клетках (кювета с решетчатой крышкой) при естественном режиме освещения (не более 4 животных на клетку). Опыты проводили в светлое время суток 12:00 - 13:00.

В первой серии экспериментов изучалось влияние осмотического стресса на структурную организацию паренхимы и ультраструктуру отдельных клеток эпифиза. Контролем служили 8 интактных крыс, имевших свободный доступ к воде и пище. Крысы опытной группы (N=8) подвергались 48-часовой водной и пищевой депривации (осмотический стресс). По окончании срока депривации животных декапитировали и извлекали эпифиз для электронномикроскопического и светооптического исследования.

Методика исследования ультраструктуры клеток эпифиза. Использовалась стандартная методика заливки гистологического материала в ЭПОН. Ультратонкие срезы получали на ультратоме LKB-III. После контрастирования в уранилацетате и

цитрате свинца проводили просмотр и фотографирование срезов на электронном микроскопе "Hitachi-300".

Методика морфометрического исследования паренхимы эпифиза. «Толстые» (3-5 мкм) срезы, изготовленные на ультратоме, окрашивали «Метиленовым голубым - азуром – фуксином». Просмотр и сканирование срезов в память компьютера проводили на световом микроскопе с цифровой видеокамерой под управлением программного обеспечения «Иста Видео-Тест» (Россия). Морфометрический анализ изображений проводился в программе "SigmaScan Professional 5" (SPSS Inc., США), которая позволила определить размеры отдельных клеток и их ядер, выделить различные по оптической плотности клеточные популяции и оценить занимаемую ими площадь, измерить просветы сосудов и площадь, занимаемую на срезах липидными каплями и секреторными гранулами, а также рассчитать средние и дисперсии для измеренных значений.

Флуоресцентно-микроскопическое исследование содержания в клетках эпифиза РНК и связанного кальция. Использовали: 10 крыс, имевших свободный доступ к воде и пище в качестве контроля и 10 крыс, подвергнутых осмотическому стрессу. Крыс декапитировали, эпифизы извлекали и немедленно замораживали. На замораживающем микротоме изготавливали криостатные срезы одинаковой толщины (около 20 мкм), переносили на предметное стекло и окрашивали водными растворами акридинового оранжевого (200 мкг/мл; рН 7,4; 10 мин) или хлортетрациклина (250 мкг/мл, рН 7,4, 15 мин). Просмотр срезов проводили на флуоресцентном микроскопе МЛД-1У1.1. Интенсивность свечения измеряли, проецируя изображение фрагментов срезов одинаковой площади на фотодатчик. Комплекс хлортетрациклина со связанным кальцием имеет спектр возбуждения ( $\lambda=410$  нм) и флуоресценции ( $\lambda=520$  нм). Для комплекса акридинового оранжевого с РНК возбуждение проводилось при  $\lambda=503$  нм, а свечение регистрировалось на  $\lambda=640$  нм.

Методика исследования продукции белка C-Fos в эпифизе. Для определения белка C-Fos в клетках эпифиза использовались интактные и подвергнутые осмотическому стрессу животные (N=24): 6 крыс, имевших свободный доступ к воде и пище служили в качестве контроля; 6 крысам, имевшим свободный доступ к воде и пище, 4 раза с 12 часовыми интервалами интраназально вводили 50 мкл эпиталона в дозе 0.5 мкг/крысу (синтетический тетрапептид эпифиза Ala-Glu-Asp-Gly, НИИ биорегуляции и геронтологии РАМН, С.-Петербург); 6 крыс были подвергнуты 48-часовой водной и пищевой депривации; 6 крысам, подвергнутым 48-часовой водной и пищевой депривации интраназально вводили эпиталон в той же дозе. Через 2 часа после последней инъекции животных декапитировали и эпифизы подвергались стандартной гистологической обработке для заливки в парафин. На микротоме изготавливали срезы (5 мкм) для непрямого иммуно-гистохимического выявления бела C-Fos: инкубировали с C-Fos-антителами (Santa-Cruz, США), затем со вторыми антителами, представляющими собой антивидовой конъюгат с пероксидазой хрена (Sigma), выявляли пероксидазу при помощи смеси диаминобензидаина с перекисью водорода. Съёмка окрашенных препаратов проводилась аналогично предыдущей методике. О присутствии белка C-Fos судили по появлению характерной коричневой окраски.

Электрофизиологическое исследование спонтанной активности клеток эпифиза. Использовали следующие группы животных: 30 интактных крыс в качестве контроля; 30 крыс подвергались осмотическому стрессу; 10 крыс-самок разведения НИИ онкологии им. проф. Н.Н. Петрова (5 интактных и 5 животных с опухолью толстой кишки, индуцированной длительным введением канцерогена диметилгидразина (ДМГ)). Электрическая активность клеток оценивалась при помощи микроэлектродной регистрации разрядов пинеалocитов. Наркотизированные уретаном крысы (1.1 г/кг массы тела, внутривентриально) помещались в стереотаксический прибор.

Производилось удаление фрагмента кости черепа (диаметром 5 мм) в области брегмы, перевязывался венозный синус. Внеклеточная регистрация потенциалов проводилась при помощи стеклянного микроэлектрода, заполненного 3M NaCl (диаметр кончика 10-30 мкм, сопротивление 1-2 МОм). Такое сопротивление электрода позволяет одновременно регистрировать разряды нескольких клеток, прилежащих непосредственно к его кончику. Сигнал с микроэлектрода усиливался ( $KU = 1000$ ) и затем оцифровывался при помощи звуковой платы «Creative Labs SB 16» под управлением программы «Cool-Edit Pro» (Syntrillium Inc., США). Для обработки записей спонтанной электрической активности клеток использовалась разработанная нами компьютерная программа (SMP v5.0), позволяющая определять частоты и характер разрядов отдельных клеток, а также проводить их простейшую статистическую обработку. В двух отдельных экспериментах для выяснения связи между электрической активностью клеток и экзоцитозом секреторных гранул в микроэлектродный раствор добавлялся колхицин в концентрации 0.01M, блокирующий разборку микротрубочек и процессы экзоцитоза в клетке.

Фармакологический анализ адренергической регуляции пинеалоцитов. В шести электрофизиологических экспериментах (3 контрольных и 3 крысы при осмотическом стрессе) в микроэлектродный раствор добавляли норадреналин-гидрохлорид в концентрации 0.01 M или блокаторы  $\alpha$ - (фентоламин) и  $\beta$ -адренорецепторов (анаприлин) в концентрации 0.001 M, которые вводили в межклеточную жидкость через кончик микроэлектрода под давлением при помощи масляного микроинъектора одновременно с регистрацией электрической активности клеток.

Изучение влияния стимуляции обонятельного эпителия на функциональную активность клеток эпифиза. Во время записи спонтанной клеточной активности эпифиза контрольные (N=6) и подвергнутые водной и пищевой депривации крысы (N=9) подвергались билатеральной электрической стимуляции обонятельного эпителия при помощи двух серебряных биполярных электродов, которые вводились в носовые ходы на глубину 5-6 мм (параметры раздражающего тока: 40 В, 100 Гц, 50 мсек в течение 15с).

Изучение влияния интраназального введения пептидных препаратов на функциональную активность клеток эпифиза. Во время записи спонтанной клеточной активности эпифиза контрольным крысам билатерально интраназально вводили растворы: эпиталона (50 мкл, 0,5 мкг/крысу, N=8); эпиталамина (пептидного экстракт эпифиза крупного рогатого скота - 50 мкл, 10 мкг/крысу, N=4); окситоцина (50 мкл, 0,5 мкг/крысу, N=3). В качестве контроля вводили физиологический раствор (N=3).

Методика исследования действия аппликаций эпиталона на электрическую активность пинеалоцитов in vitro. В 6 опытах при помощи стеклянного микроэлектрода проводилась регистрация разрядов пинеалоцитов на извлеченном из тела крысы эпифизе, помещенном в аэрируемый, термостатируемый (37°C) физиологический раствор. Эпиталон добавляли в ванночку с эпифизом в процессе опыта в количестве, достаточном для создания в инкубационной среде концентрации препарата  $10^{-7}$ M.

Методика определения индольных и олигопептидных фракций в ткани эпифиза крысы методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Эпифизы 5 интактных и 5 подвергнутых осмотическому стрессу крыс использовались для получения олигопептидного и индольного экстракта эпифиза, который затем исследовался с применением высокоэффективной жидкостной хроматографии на хроматографе "Цвет 3110". Оптическую плотность веществ на выходе хроматографической колонки измеряли при длине волны 206 нм. Концентрация веществ вычислялась по площади пиков хроматограммы, соответствующих стандартам серотонина, мелатонина, окситоцина, вазопрессина, эпиталона и вазотоцина.

Статистическая обработка результатов. Для записей электрической активности проводился программный поиск отдельных разрядов в мультиклеточной записи и идентификация разрядов отдельных клеток в разработанной нами программе «SMP 5.0» следующими способами: 1) построение гистограммы распределения амплитуд разрядов; 2) разделение разрядов по полярности; 3) построение совместного распределения по амплитуде, продолжительности де- и реполяризации; 4) вычисление автокорреляционной функции для поиска периодических процессов и зависимостей между разрядами клеток; 5) наложение множества периодических промежутков равной длины для выявления периодических процессов; 6) наложение множества промежутков, начинающихся разрядом с заданными параметрами, для выявления отвечающих на него разрядов других клеток (поиск межклеточных взаимодействий). В большинстве опытов частоты разрядов клеток с каким-то одним типом активности в пределах одной выборки были распределены нормально и для проверки гипотезы о достоверности различий между группами использовался непарный t-критерий Стьюдента ( $P < 0.05$ ); при ненормальном распределении применялся тест Манна-Уитни. Оценка результатов измерений площадей клеток, интенсивностей светимости клеток, концентрации гормонов и других данных проводилась с использованием непарного t-критерия Стьюдента при  $P < 0.05$ . Статистические вычисления проводились в программе SPSS v10.0 (SPSS Inc., США), а построение графиков в программе Excel 97 (Microsoft, США).

#### РЕЗУЛЬТАТЫ ИСЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние осмотического стресса на ультраструктуру пинеалоцитов. У интактных животных ядра светлых клеток имели диффузно распределенный хроматин и четкое ядрышко, в цитоплазме этих клеток обнаружено большое количество удлинённых митохондрий. Цистерны аппарата Гольджи не гипертрофированы. Отсутствуют секреторные гранулы в отростках клеток, в примембранных областях имеется множество микротрубочек, что указывает на слабую секреторную активность светлых пинеалоцитов у интактных животных в светлое время суток. Это заключение кажется справедливым в свете имеющихся данных о барьерной функции цитоскелета на предшествующих экзоцитозу стадиях, (Фултон, 1987; Aunis, Bader 1988; Miyamoto 1995).

У крыс, которые подвергались 48-часовой водной и пищевой депривации, в светлых пинеалоцитах были выявлены признаки активации синтеза и освобождения веществ белково-пептидной природы: большое количество секреторных гранул с плотным центром (dense cored vesicles) и с зернистым белково-пептидным содержимым в цитоплазме, отростках и межклеточных пространствах. Особенности цитоскелета этих клеток (множество микротрубочек в районе секреторных гранул), вероятно, свидетельствуют об активации транспортных процессов в цитоплазме. Наблюдались гипертрофия цистерн аппарата Гольджи и вакуолизация митохондрий. Значительное накопление в пинеалоцитах липидных капель приводило также к слиянию их с секреторными гранулами и образованию структур, названных Дж.Миличином (Milin, 1981) «тельцами-контейнерами».

Выявленные изменения ультраструктуры светлых пинеалоцитов можно рассматривать как признаки активации секреторных процессов в эпифизе, соответствующие очевидно, второй фазе стрессорного ответа эпифиза, а именно экстрезии секреторных продуктов пептидной природы.

Существенных изменений ультраструктуры темных пинеалоцитов при осмотическом стрессе выявлено не было.

Влияние осмотического стресса на структурную организацию паренхимы эпифиза крыс. Паренхима эпифиза интактных крыс характеризуется преобладанием светлых

пинеалоцитов. Особенности ее организации соответствуют описанному в литературе нормальному состоянию железы (Fujita, 1988; Kunwar, 1992). Содержание липидов в клетках незначительно, капиллярные, перикапиллярные и межклеточные пространства не расширены. Морфометрические показатели, характеризующие состояние паренхимы эпифиза intactных крыс и животных, подвергнутого осмотическому стрессу, представлены на рис. 1.

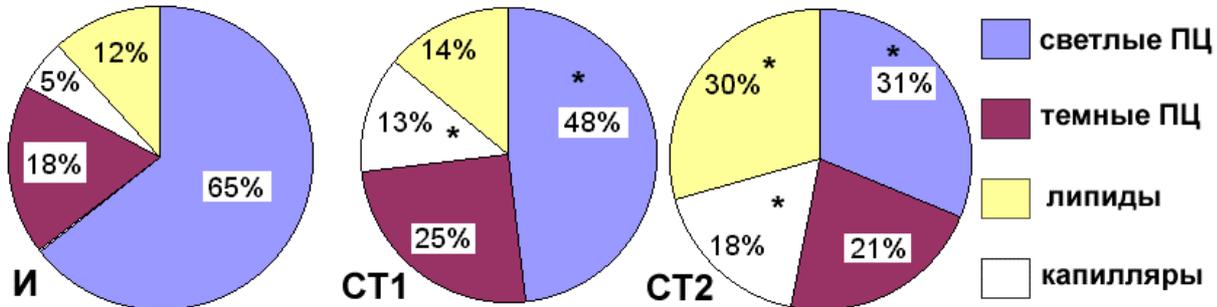


Рис.1. Отличия площади, занимаемой на срезе эпифиза цитоплазмой темных и светлых пинеалоцитов, липидами и капиллярами. И – intactные животные. ST1 и ST2 – крысы, разделенные по индивидуальным особенностям на животных со средней и высокой степенью выраженности структурных изменений железы, соответственно). Достоверные различия показателей intactных и депривированных крыс обозначены звездочками.

При осмотическом стрессе обнаружено достоверное снижение объема активной цитоплазмы без липидных капель пинеалоцитов. Можно полагать, что увеличение осмолярности крови в капиллярах эпифиза, вызванное 48-часовой водной и пищевой депривацией, сопровождается усилением выхода воды и секреторных продуктов из светлых пинеалоцитов, что приводит к уменьшению их размеров. Последнее, возможно, обусловлено характерным для II-стадии общего адаптационного синдрома увеличением в крови концентрации глюкокортикоидных гормонов, и высокой проницаемостью сосудистого русла эпифиза. Усиление секреторной активности эпифиза, наблюдаемое при различных видах стресса имеет место только в светлое, но не темное время суток (Champney et al., 1985; Lynch et al., 1977), что, по мнению некоторых авторов, связано с циркадной ритмикой синтеза глюкокортикоидов и мелатонина, находящейся обычно в противофазе (Арушанян, 1993). Многие исследователи полагают, что эпифиз в условиях стресса начинает выполнять функции прямого корректора центральных и периферических эндокринных механизмов (Слепушкин, Пашинский, 1982; Арушанян, 1991, 1993; Mess, 1983).

Суммарная площадь, занимаемая "светлыми" клетками, при стрессе достоверно уменьшается, а увеличение степени выраженности структурных изменений эпифиза при осмотическом стрессе сочетается с усилением липидизации. У крыс с сильными структурными изменениями паренхимы эпифиза количество липидов возросло почти в 4 раза по сравнению с контролем, что согласуется с электронномикроскопическими данными. Можно предполагать, что источником большого количества липидов в паренхиме эпифиза служат жирные кислоты и другие субстраты липидного обмена, содержание которых в крови при стрессе обычно увеличивается (Меерсон, 1993). В пользу этого предположения говорит наиболее интенсивное накопление липидных капель в пинеалоцитах, прилежащих к капиллярам, объем которых в эпифизе при осмотическом стрессе возрастал в 7 раз. Расширение просветов капилляров и открытие ранее спавшихся сосудов приводят к замедлению капиллярного кровотока и увеличению в них кровяного давления, создавая условия для эффективного транскапиллярного транспорта секреторных продуктов пинеалоцитов в кровь и метаболитических субстратов обратно в клетки эпифиза.

Светооптическое исследование выявило достоверное  $102\pm 13\%$  увеличение площади, занимаемой на срезе секреторными гранулами при осмотическом стрессе, по сравнению с контролем, а также  $330\pm 40\%$  увеличение объема ядрышек светлых пинеалочитов, что обычно рассматривается как признак усиления процессов синтеза белка в клетке.

Влияние осмотического стресса на содержание в клетках эпифиза РНК и связанного с белком кальция. При осмотическом стрессе выявлено увеличение содержания цитоплазматической РНК в пинеалочитах на  $320\pm 70\%$  по сравнению с интактными животными, что говорит об активации процессов синтеза белка и согласуется с полученными нами данными об увеличении размера ядрышек. Флуоресценция срезов эпифиза, окрашенных хлортетрациклином, при стрессе была на 150% интенсивнее, чем в контроле. Это указывает на повышение количества связанного кальция в пинеалочитах вследствие входа его в клетку из внеклеточного пространства. Высокая концентрация ионизированного кальция в пинеалочитах при осмотическом стрессе вероятно приводит к: разборке микротрубочек в теле пинеалочитов и в примембранных областях (Фултон, 1987), вакуолизации аппарата Гольджи и митохондрий, а также к активации синтеза белка.

Влияние осмотического стресса на содержание в эпифизе крыс веществ индольной и пептидной природы. Высокоэффективная жидкостная хроматография экстрактов эпифиза интактных и подвергнутых водной и пищевой депривации крыс показала, что при стрессе происходит приблизительно двукратное увеличение содержания серотонина ( $P < 0.05$ ) при трехкратном снижении содержания мелатонина ( $P < 0.05$ ), по сравнению с контролем, вероятно из-за снижения активности N-ацетилтрансферазы. Можно предполагать, что эти изменения являются следствием тормозящего действия кортикостерона на путь превращения серотонина в мелатонин.

При осмотическом стрессе обнаружено значительное увеличение в экстракте эпифиза фракции гидрофильных пептидов (1-10 кДа). Вероятно, эта фракция является основным компонентом гранул с пептидным содержанием, накопление которых при осмотическом стрессе зарегистрировано в пинеалочитах методами электронной и световой микроскопии. В эпифизе при осмотическом стрессе отмечено 3,5-кратное увеличение содержания вазопрессина, вероятно освобождающегося из нервных терминалей паравентрикулярного и супраоптического ядер гипоталамуса и поступающего из плазмы крови. Известно, что при осмотическом стрессе усиливается продукция вазопрессина гипоталамо-гипофизарной системой и увеличивается его концентрация в плазме крови (Aguilera, 1993).

Электрофизиологическое исследование эпифиза крыс в норме и при осмотическом стрессе. Пинеалочиты по своей структуре и физиологии напоминают нейросекреторные клетки, у которых приход потенциала действия в нейросекреторное окончание вызывает деполяризацию плазматической мембраны, приводящую к открытию потенциал-зависимых кальциевых ионных каналов и входу  $Ca^{2+}$  в клетку, а также к выходу  $Ca^{2+}$  из внутриклеточных депо, увеличению в цитоплазме концентрации свободных ионов кальция и выделению секреторного продукта путем экзоцитоза (Douglas, 1974; Nordmann, 1983, Meyer, 1987). Потенциалы действия пинеалочитов отличаются от таковых у нейронов большей продолжительностью, что связано с медленными кальциевыми ионными каналами. У пинеалочитов осцилляции ионов кальция в цитоплазме также неразрывно связаны с везикулярной секрецией (D'Souza, Dryer, 1994). Колхицин способен блокировать разборку микротрубочек и останавливать процессы экзоцитоза, которые напрямую зависят от деятельности цитоскелета (Dustin, 1978). В наших опытах с добавлением в микроэлектродный раствор колхицина мы получили остановку электрической

активности клеток, прилежащих к кончику микроэлектрода, что показывает четкую связь разрядов пинеалоцитов с выбросом ими секреторных гранул.

Исследование записей спонтанной мультиклеточной активности клеток эпифиза показало возможность выделения из нее «голосов» отдельных клеток. По характеру разрядов клеток нами были выделены пинеалоциты с регулярной, нерегулярной и пачечной активностью. Кроме того, пинеалоциты достоверно разделялись на подгруппы с «быстрым» (частота > 4 Гц) и «медленным» (частота < 2 Гц) типами активности. При этом «медленный» тип был представлен клетками с регулярными, нерегулярными и пачечными разрядами. У интактных животных нами регистрировались, как правило, только регулярно и нерегулярно разряжающиеся пинеалоциты с «медленным» типом активности, то есть малоактивные клетки.

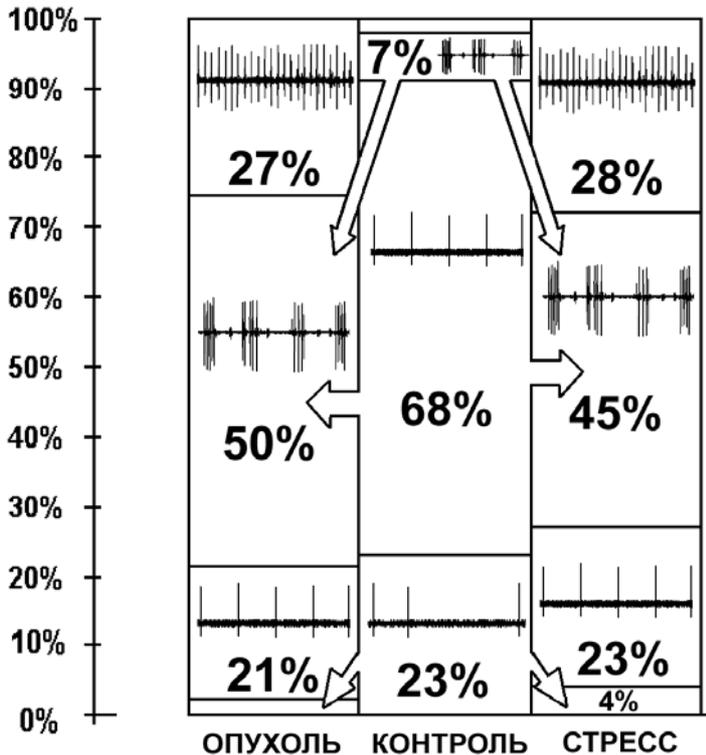


Рис.2. Сравнительная диаграмма влияния осмотического стресса и опухоли толстой кишки на соотношение пинеалоцитов с различными типами импульсной активности.

У крыс, подвергнутых осмотическому стрессу, наблюдалась активация электрических процессов в эпифизе: выявлялись клетки с пачечной активностью, практически отсутствовавшие в контроле; частота «медленной» компоненты увеличивалась в 4-6 раз за счет перехода клеток от регулярных разрядов к пачечным; появлялся практически отсутствовавший в контроле «быстрый» тип клеточной активности. При этом изменялось соотношение клеток с различными типами разрядов в пользу более активных клеток (рис.2). Увеличение доли клеток с пачечным типом разрядов является важным признаком активации секреторных процессов в пинеалоцитах, подобно тому как появление пачечных спайков у нейросекреторных клеток приводит к резкому усилению выброса ими секреторного материала.

Исследование роли адренергической регуляции в контроле пептидной секреции в эпифизе. Норадренергическая регуляция деятельности эпифиза симпатической нервной системой – самый известный механизм регуляции продукции мелатонина. Именно через этот механизм осуществляется циркадная регуляция секреции мелатонина в зависимости от освещенности (Yu, Reiter, 1993). В темное время суток симпатические нервные окончания, приходящие из верхнего шейного симпатического ганглия, выделяют норадреналин, который действует на  $\alpha$ - и  $\beta$ -адренорецепторы на

мембране пинеалоцитов, усиливая выработку железой мелатонина (Yu,Reiter,1993). При стрессе, особенно в I-фазу общего адаптационного синдрома, происходит усиление выброса норадреналина симпатическими нервными окончаниями, что, в большинстве случаев, приводит к усилению секреции мелатонина эпифизом (Milin, 1974, 1981, 1984; Champney, 1985; Арушанян и др., 1993). Для проверки роли адренергической регуляции в контроле пептидной секреции в эпифизе была проведена серия опытов с добавлением в микроэлектродный раствор норадреналина. Норадреналин не вызывал существенных изменений электрической активности клеток эпифиза, что может быть связано с подавлением его связывания с  $\beta$ -адренорецепторами под действием глюкокортикоидов, концентрация которых в крови возрастает во II-фазу общего адаптационного синдрома после 48-часовой водной и пищевой депривации (Folders et al., 1982). Достоверных изменений частоты разрядов пинеалоцитов после аппликации растворов  $\alpha$ - и  $\beta$ -адреноблокаторов обнаружено не было. Таким образом, активация эпифиза электрических процессов при осмотическом стрессе не зависит от адренергической регуляции.

Межклеточные взаимодействия в эпифизе при осмотическом стрессе. Пинеалоциты в паренхиме эпифиза лежат довольно тесно и образуют друг с другом плотные (Ishimura,1992) и щелевые (Viviana et al., 2000) контакты, а также «лентовидные синапсы» (Ishimura,1992), проницаемые для таких сигнальных факторов, как циклический АМФ и  $Ca^{2+}$ , обеспечивающих электрическую связь соседних пинеалоцитов и синхронизацию их работы (Viviana et al., 2000). В условиях активации электрических процессов в эпифизе у животных при осмотическом стрессе нами показаны группы из 3-7 соседних взаимодействующих пинеалоцитов (рис.3). Можно предполагать, что причина перехода части пинеалоцитов с нерегулярного на регулярный тип активности также кроется в навязывании высокоактивными клетками-ритмоводителями своего типа активности соседним пинеалоцитам.

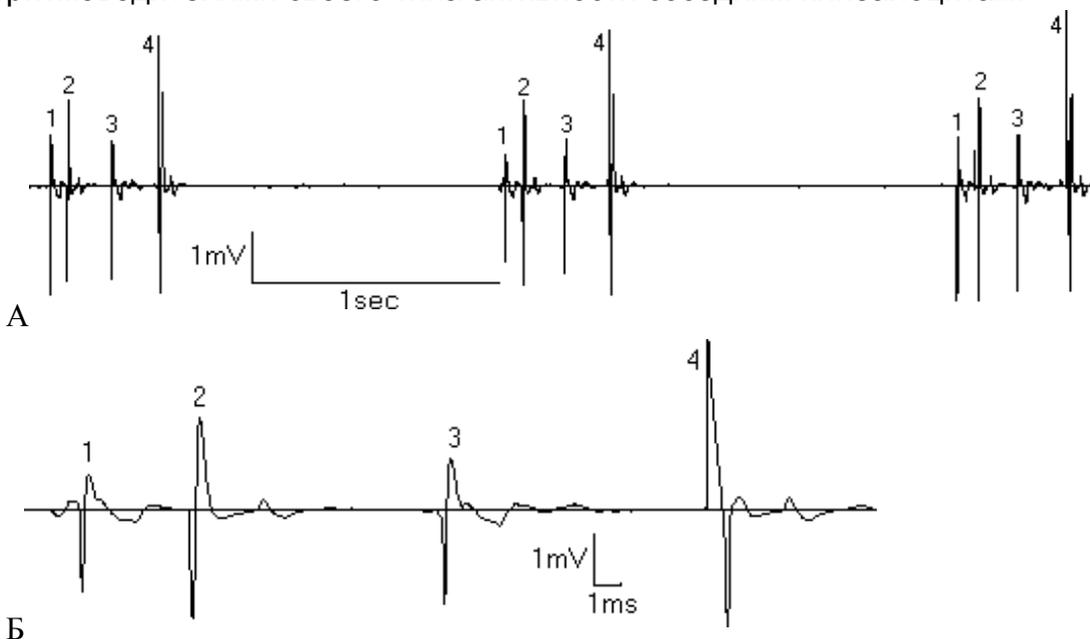


Рис. 3. Запись электрической активности группы из 4-х взаимодействующих клеток в эпифизе крысы при осмотическом стрессе (клетка 1 задает ритм клеткам 2,3 и 4)

Влияние онкогенного стресса на электрическую активность клеток эпифиза. Опухоль толстой кишки, обеспечивающей всасывание воды и моносахаридов, является мощным фактором, нарушающим метаболические процессы в организме, приводя к развитию общего адаптационного синдрома. У животных экспериментальной группы с

опухольями толстой кишки (N=5) также, как и у крыс, подвергнутых осмотическому стрессу, была выявлена активация электрической активности пинеалоцитов. Изменения характера разрядов и соотношения клеток разных типов у крыс с опухолью толстой кишки и у животных при осмотическом стрессе были чрезвычайно похожи (рис.2). Сходство изменений электрической активности пинеалоцитов, вызываемых осмотическим стрессом и развитием опухоли толстой кишки, позволяет предполагать общий характер реакций эпифиза на различные виды хронических экстремальных воздействий.

Влияние стимуляции обонятельного эпителия на электрическую активность клеток эпифиза. Управление деятельностью эпифиза со стороны зрительной системы известно уже довольно давно и носит периодический характер в силу смены светлого и темного времени суток. Тем не менее у крыс информационный поток, передаваемый в мозг обонятельной системой, может иметь в их жизни даже большее значение, чем зрение. В наших опытах электрическая стимуляция обонятельного эпителия или интраназальное введение холодного физиологического раствора (4°C) приводили к достоверному снижению суммарной частоты разрядов клеток эпифиза у интактных животных и у крыс при стрессе: при стимуляции обонятельного эпителия, главным образом, снижалась частота разрядов «медленной» компоненты, а клетки с «быстрым» типом активности не реагировали. Примененные методы стимуляции обонятельного эпителия представляют собой неспецифический способ воздействия. Их действие, скорее всего, опосредовано через нервные связи эпифиза и обонятельных структур (Ronnekleiv, Moller, 1979) и проявляется очень быстро: через 1-2 сек после начала раздражения.

Влияние интраназальных инфузий пептидных препаратов на электрическую активность клеток эпифиза. Проникновение веществ в ЦНС, минуя гематоэнцефалический барьер, возможно благодаря существованию анатомической связи между мозгом и носовой полостью: происходит постоянная диффузия ликвора через подпаутинное пространство вдоль ольфакторных нейронов к носовой подслизистой и лимфатической сети (Bradbury, Cserr, 1985; Kida et al., 1993). Предполагают, что именно этим путем множество веществ, включая металлы, красители, вирусы, пептиды (Pietrowski et al., 1996), белки, наркотики проникают в мозг через носовую полость, минуя гематоэнцефалический барьер (Chen et al., 1998). Для ряда веществ, включая пероксидазу хрена, фактор роста нервов, антибиотик цефалексин, стероидные гормоны, было показано их проникновение в ЦНС этим путем (Frey et al., 1997).

Проведенные нами опыты с интраназальными введениями пептидных препаратов выявили двухфазную реакцию клеток эпифиза. Первая, через несколько секунд после введения неспецифическая реакция клеток железы обусловлена нервными связями с обонятельными структурами. Вторая – специфическая реакция развивается через 5-8 минут после инъекции и вызывается проникновением апплицированных веществ в ЦНС и в эпифиз. Интраназальное введение эпиталамина приводило к достоверному 30%-ному снижению частоты разрядов всех типов пинеалоцитов через 5-8 минут после введения. Известно, что эпиталамин является комплексным препаратом и содержит множество пептидов (Хавинсон, Морозов, 1998). Его эффекты на эпифиз могут иметь множественный характер и опосредоваться через другие мозговые структуры. Начало действия эпиталона наблюдалось через 6-8 минут после введения. Эпиталон на 35-40% снижал частоту редко разряжающихся клеток (0,05-0,01 имп/сек) с нерегулярным типом активности и в среднем на 25% (P<0.05) снижал частоту разрядов более часто разряжающихся клеток (2,0-0,4 имп/сек) с регулярным типом активности. Интраназальное введение окситоцина

оказывало подавляющий эффект на суммарную частоту разрядов пинеалоцитов, но этот эффект наблюдался только у части животных.

Влияние эпиталона на электрическую активность пинеалоцитов in vitro. Немедленное подавляющее действие эпиталона на частоту разрядов пинеалоцитов при прямой аппликации в концентрации  $10^{-7}$ М, может быть связано с тем, что этот пептид синтезирован на основе анализа аминокислотных последовательностей собственных пептидов эпифиза и подавляет секрецию в пинеалоцитах по принципу короткой обратной связи. Сходство эффектов эпиталона при интраназальном введении и при прямой аппликации на эпифиз позволяет предполагать, что пептид при интраназальном введении действительно достигает эпифиза и его эффекты не опосредуются другими мозговыми структурами.

Исследование роли гена c-fos в эффектах эпиталона на пинеалоциты в нормальных условиях и при осмотическом стрессе. Белок C-Fos является одним из триггеров, запускающих синтетические процессы в эпифизе при действии экстремальных факторов, в частности, при стрессе (Kovaks, 1998). В наши опытах почти полное отсутствие белка C-Fos в эпифизе крыс при осмотическом стрессе вероятно связано с хроническим характером этого стресса, поскольку наибольшее содержание продуктов протоонкогена c-fos, по литературным данным, наблюдается через 1-2 часа после воздействия стрессорного фактора (Shang et al., 1988; Sasson-Corsi. et al., 1989). Небольшое, но достоверное повышение содержания белка C-Fos в пинеалоцитах при стрессе наблюдалось только после интраназальных введений эпиталона. Полученные данные согласуются с гипотезой (Кузник и др., 1998) о возможном пути действия цитомединов (и их компонентов) через активацию гена c-fos. Тот факт, что данный эффект эпиталона наблюдался только при стрессе, говорит о его участии в пептидной саморегуляции деятельности эпифиза при экстремальных состояниях организма.

Заключение. На основании анализа результатов экспериментов и ряда литературных данных мы можем описать общие закономерности секреторных процессов в эпифизе крыс после 48-часовой водной и пищевой депривации. Длительный осмотический стресс приводит к увеличению осмолярности крови и мочи и, судя по литературным данным, к повышенному содержанию в плазме крови гормонов коры надпочечников, по крайней мере в дневное время. Это состояние организма соответствующее II-фазе общего адаптационного синдрома, сопровождается существенным увеличением объема капиллярного русла эпифиза и облегчением транскапиллярного транспорта секреторных продуктов эпифиза, гормонов и жиров. Наблюдаемые при осмотическом стрессе изменения гемодинамики железы приводят к липидизации пинеалоцитов и уменьшению их объема из-за интенсивного выведения секреторных продуктов и воды, вероятно под действием глюкокортикоидов. Тормозящее действие последних на связывание норадреналина с  $\beta$ -адренорецепторами, скорее всего, ответственно за выявленное нами снижение чувствительности пинеалоцитов к действию норадреналина, а также за снижение продукции мелатонина при одновременном усилении образования серотонина в пинеалоцитах при стрессе. Действие глюкокортикоидов и, возможно, других пока неизвестных регуляторных факторов вызывает усиление синтеза белка и образование секреторных гранул в пинеалоцитах. Длительное повышение частоты разрядов пинеалоцитов при осмотическом стрессе приводит к увеличению содержания в них кальция, который помимо усиления синтетических процессов в клетках вызывает изменения цитоскелета (разборка примембранных микротрубочек), направленные на облегчение выброса белок-содержащих секреторных везикул. Экзоцитоз последних количественно связан с уровнем электрической активности пинеалоцитов. Переход части клеток эпифиза при осмотическом и онкогенном стрессе с регулярного на пачечный тип разрядов, по-

видимому, является особенно значимым изменением, так как именно пачечный тип разрядов у нейросекреторных клеток наиболее эффективно запускает выведение секреторного материала. Обнаруженные нами в условиях усиления секреторной активности межклеточные взаимодействия обеспечивают вовлечение в секреторный процесс и синхронизацию работы соседних пинеалоцитов.

Некоторые вещества белково-пептидной природы, вырабатываемые эпифизом, помимо разнообразных гормональных эффектов в организме могут оказывать обратные регуляторные влияния на секреторные процессы в железе, в том числе по механизму коротких отрицательных обратных связей в чрезвычайно низких физиологических концентрациях. Сходство их действия на эпифиз в опытах *in vivo* и *in vitro* говорит о существовании рецепторов к ним в самом эпифизе, однако этот вопрос нуждается в дальнейшей разработке.

Примененный нами интраназальный способ введения пептидных препаратов оказался эффективным путем воздействия на активность эпифиза через попадание введенных интраназально веществ в мозговые структуры и сам эпифиз.

### ВЫВОДЫ

1. В дневное время секреторная активность эпифиза невелика, но при осмотическом стрессе по данным электронной и световой микроскопии в светлых пинеалоцитах усиливается образование и облегчается его выведение секреторного материала, а по данным флуоресцентной микроскопии усиливается синтез РНК в клетках и растет содержание в них связанного кальция.
2. Методом высокоэффективной жидкостной хроматографии выявлены рост содержания в железе вазопрессина и гидрофильных полипептидов (1-10 кДа) и торможение превращения серотонина в мелатонин. В электрофизиологических опытах показано снижение чувствительности эпифиза к адренергической регуляции.
3. При осмотическом и онкогенном стрессе процесс экстррузии белково-пептидного секреторного материала сопровождается активацией электрической активности клеток эпифиза за счет увеличения доли пинеалоцитов с «быстрым» и «пачечным» типами активности и межклеточных взаимодействий.
4. В обычных условиях, а также при осмотическом и онкогенном стрессе электростимуляция обонятельного эпителия и интраназальные введения или прямые аппликации эпиталамина, эпиталона и окситоцина тормозят активность редко разряжающихся малоактивных пинеалоцитов. Полученные данные свидетельствуют о более сложном регуляторном характере действия пептидов эпифиза, чем простое торможение или стимуляция секреции.
5. Прямое действие эпиталона на пинеалоциты может осуществляться через систему генов раннего стрессорного ответа, в частности ген *c-fos*, но только на фоне хронического стресса.

### СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

- 1) Коваленко Р.И., Сибаров Д.А., Павленко И.Н., Лукьянова Е.Л., Ноздрачев А.Д. Структура пинеалоцитов крысы при стрессе и после унилатеральных и интраназальных введений окситоцина // Росс. физиол. журн. им.И.М.Сеченова, 1997, Т.83, N8, с.87-93.
- 2) Kovalenko R.I., Sibarov D.A., Nozdrachev A.D. The influence of unilateral olfactory epithelium stimulation on rat pineal cells during the stress // *Advances in Comparative Endocrinology, Proceedings of the 13th International Congress of Comparative Endocrinology*, Yokohama, Japan, 1997, p.697-700.
- 3) Сибаров Д.А. Компьютерный анализ спонтанной электрической активности клеток

- эпифиза // Труды победителей конкурса грантов 1998 года для студентов, аспирантов и молодых ученых Санкт-Петербурга, 1998, с.200-201.
- 4) Сибаров Д.А., Коваленко Р.И., Ноздрачев А.Д., Особенности функционирования пинеалоцитов крыс при стрессе в светлое время суток // Росс.Физиол.журн., 2000, Т.86, N8, с.1049-1052.
- 5) Sibarov D.A., Kovalenko R.I., Anisimov V.N, Nozdrachev A.D. Daytime pineal gland activation in rats with colon tumors induced by 1,2-dimethylhydrazine // Neuroendocr.Lett., 2000, V.21, p.307-312.
- 6) Kovalenko R.I., Sibarov D.A., Nozdrachev A.D. The influence of unilateral olfactory epithelium stimulation on rat pineal cells during the stress // Abstracts of 13th International Congress of Comparative Endocrinology, November 16-21, Yokohama, Japan, 1997, p.65.
- 7) Sibarov D.A., Kovalenko R.I. Oxytocin as a regulator of pineal gland cells secretory activity // XXXIII International Congress of Physiological Sciences, St.Petersburg, 1997, P070.34.
- 8) Коваленко Р.И., Новикова И.А., Сибаров Д.А. Роль окситоцина в симпатической регуляции функций эпифиза // Материалы международного симпозиума "Проблемы interoцепции" (Interoception problems), С.Петербург, 1997, с.53-54.
- 9) Коваленко Р.И., Ноздрачев А.Д., Сибаров Д.А. Исследование роли окситоцина в регуляции секреторных процессов в эпифизе при стрессе // Материалы конференции "Эндокринные механизмы регуляции в норме и патологии", Новосибирск, 1997, с.79-80.
- 10) Сибаров Д.А., Компьютерный анализ спонтанной электрической активности клеток эпифиза // Материалы конференции "Человек и его здоровье", С.Петербург, 1998, с.38.
- 11) Коваленко Р.И., Сибаров Д.А., Ноздрачев А.Д. Роль пептидов в регуляции эпифиза // Материалы XVII-съезда Всероссийского физиологического общества им. И.П.Павлова, Ростов-на-Дону, 1998, с. 407.
- 12) Sibarov D.A., Kovalenko R.I., Nozdrachev A.D. Osmotic Stress Influences The Structure And Function Of The Pineal Gland // Society for Neuroscience 28th Annual Meeting, 1998, H-87.
- 13) Kovalenko R.I., Novikova I.A., Sibarov D.A., Anisimov V.N., Klimashevskii V.F., Nozdrachev A.D. Adaptive Morphofunctional Changes Of Pineal Cells During Tumor Process In The Large Intestine // III-International Congress of Pathophysiology, Lahti, Finland, in Pathophysiology, 1998, v.5., suppl.1, p.154.
- 14) Sibarov D.A., Kovalenko R.I., Nozdrachev A.D. Functional heterogeneity of pinealocytes in connection with different mediators influence // 27th Gottingen Neurobiology Conference, Gottingen, Germany (May 27-30), 1999, N870.
- 15) Сибаров Д.А., Коваленко Р.И., Анисимов В.Н. Дневное усиление пептидной секреции в эпифизе крыс при осмотическом стрессе и при опухоли толстой кишки // Материалы конференции «Нейроэндокринология-2000», С.Петербург, 2000 (18-20 апреля), с.116.
- 16) Sibarov D.A., Kovalenko R.I., Anisimov V.N., Nozdrachev A.D. Pineal gland activation in rats with colon tumors induced by 1,2-dimethylhydrazine // Federation of European Neuroscience Societies (Millenium meeting, 24-28 june ) 2000, Brighton, U.K., N107.4, p.225.
- 17) Sibarov D.A., Kovalenko R.I. Daytime stress-induced pineal gland structural changes // 28<sup>th</sup> Gottingen Neurobiology Conference (june 7-10), Gottingen, Germany, 2001, N1022.
- 18) Sibarov D.A., Kovalenko R.I., Chernysheva M.P., Nozdrachev A.D. Intranasal Pineal Peptide Infusions Influence Rat Behaviour and Pineal Activity in Chronic Osmotic Stress // Regional ISPNE Congress (June 2-5), 2001, Журн. Психофармакол. и биол. нарк., 2001, N2, с.169.