

СТРУКТУРА ПИНЕАЛОЦИТОВ КРЫСЫ ПРИ СТРЕССЕ И ПОСЛЕ УНИЛАТЕРАЛЬНЫХ ИНТРАНАЗАЛЬНЫХ ВВЕДЕНИЙ ОКСИТОЦИНА

© *Р. И. Коваленко, Д. А. Сибаров, И. Н. Павленко,
Е. Л. Лукьянова, А. Д. Ноздрачев*

Кафедра физиологии человека и животных Санкт-Петербургского государственного университета, Россия, 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7/9

В условиях сочетанного стресса (48-часовая водная и пищевая депривация плюс стресс новизны) исследовались реакции клеток эпифиза белых беспородных крыс на унилатеральные интраназальные введения окситоцина. Показано наличие функциональных изменений светлых пинеалоцитов при стрессе, выразившиеся в гипертрофии структур аппарата Гольджи, вакуолизации крист митохондрий и усилении секреторных процессов. Выявлены признаки антистрессорных эффектов унилатеральных инфузий окситоцина, более выраженные при правостороннем введении. На основании полученных данных делается предположение о возможном участии окситоцинергических систем в регуляции ответов пинеалоцитов при стрессе.

Ключевые слова: эпифиз, пинеалоциты: асимметрия, окситоцин, осмотический стресс, стресс новизны.

R. I. Kovalenko, D. A. Sibarov, I. N. Pavlenko, E. L. Lukianova and A. D. Nozdratchev. THE STRUCTURE OF THE RAT PINEALOCYTES FOLLOWING STRESS AND INELATERAL INTRANASAL OXYTOCIN INJECTIONS. St. Petersburg State University, 199034, St. Petersburg, 7/9, Universitetskaya Nab., Russia.

Stress-induced functional changes in the light pinealocytes and signs of stress-limiting effect of oxytocin were revealed in white non-linear rats. The data obtained suggests involvement of oxytocinergic systems in the stress modulation of pinealocytes.

Key words: pineal glands, pinealocytes, asymmetry, oxytosin, osmotic stress.

Эпифиз наряду с гипоталамо-гипофизарным комплексом играет важную роль в осуществлении приспособительных реакций организма к изменяющимся условиям внешней и внутренней среды. В частности, эпифизарные пептиды и мелатонин участвуют в формировании реакций на осмотические [4,8] и гипоксические [2] воздействия. Методом ретроградного транспорта пероксидазы хрена показано присутствие в эпифизе крыс нервных волокон, приходящих из эпителиальной области [13], лимбической системы и гипоталамуса [6]. На основании электрофизиологических экспериментов высказано предположение, что часть этих волокон имеет нонапептидергическую природу [21]. В эпифизе крысы обнаружены вазопрессин- и окситоцин-иммунореактивные волокна, терминалы которых располагаются преимущественно в перикапиллярных пространствах [12].

При внутрижелудочковом введении окситоцина отмечалось подавление функциональной активности эпифиза у крыс в условиях стресса новизны [7]. Имеющиеся данные свидетельствуют о возможности опосредованного через эпифиз участия окситоцина в формировании стрессорного ответа организма. Кроме того, была обнаружена асимметрия центральных и периферических эффектов при унилатеральных интраназальных введениях этого нейрого르몬а [4,8]. Установлено, что активация левой обонятельной луковицы приводит к усилению симпатических влияний на

висцеральные органы и скелетную мускулатуру, тогда как правой — парасимпатических [7].

В эти эффекты окситоцина, осуществляемые через обонятельные доли, может вовлекаться эпифиз, связь которого с обонятельными долями хорошо известна [3]. Молекулы веществ, попадающих в носовые полости, могут акцептироваться мембранами одорантных рецепторов или нейронами, тела которых локализованы в обонятельных долях. Кроме того, такие вещества могут проникать через межклеточные пространства слизистой оболочки в лимфатические сосуды и церебральный кровоток [16]. Обонятельные луковицы, связанные непосредственно с ольфакторными рецепторами слизистой оболочки носовых путей, у млекопитающих формируются, как и эпифиз, вокруг бухт мозговых желудочков, обеспечивая возможную гуморальную связь этих структур через ликвор. Однако клеточные аспекты эффектов интраназальных введений окситоцина на пинеалоциты изучены недостаточно.

В связи с этим целью настоящего исследования было изучение эффектов унилатеральных интраназальных введений окситоцина на реакции пинеалоцитов у крыс в стрессорных условиях.

МЕТОДИКА

Объектом исследования служили 16 белых беспородных крыс-самцов с массой тела 160—180 г, содержавшихся в виварии СПбГУ при естественном режиме освещения. Опыты проводили в светлое время суток (12:00—13:00). Контролем являлись интактные животные, имевшие свободный доступ к воде и пище и не подвергавшиеся стрессу. Крыс опытной группы после 48-часовой водной и пищевой депривации помещали на 15 мин в открытое поле (комбинированный стресс + стресс новизны). Всех депривированных животных подразделяли на следующие экспериментальные подгруппы: 1) крысы, которым ничего не вводили; 2) крысы, которым вводили окситоцин интраназально слева; 3) крысы, которым вводили окситоцин интраназально справа. Для инфузий использовали препарат синтетического окситоцина с активностью 495 МЕ/мг (Институт органического синтеза, Латвия, Рига). Раствор окситоцина (10^{-1} г/мл) вводили с помощью микропипетки в объеме 15 мкл. После пребывания в открытом поле животных декапитировали и извлекали эпифиз. Эпифизы помещали на 1.5 ч в фиксирующую смесь, содержащую 2 % параформа и 2 % глутаральдегида в фосфатном буфере Зерингсена с конечной концентрацией 0.12 М (рН 7.3). Затем эпифизы промывали 15 мин 0.12 М фосфатным буфером с 7 % сахарозы, постфиксировали 1.5 ч в 2 %-ном растворе OsO_4 на 0.12 М фосфатном буфере, обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации, в смеси спирт-ацетон, в ацетоне и заливали в ЭПОН. «Серебристые» срезы изготавливали на ультратоме ЛКВ-III. Перед просмотром срезы контрастировались в 1.5%-ном спиртовом растворе уранилацетата. Просмотр и фотографирование производили на электронном микроскопе «Hitachi-300» при увеличении 5000, 10 000 и 20 000.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В работе был проанализирован ряд особенностей ультраструктурной организации светлых и темных пинеалоцитов, отражающих секреторную активность эпифиза. При этом рассматривались только те признаки, которые наблюдались более чем у 80 % исследованных клеток и были легко опознаваемы на качественном уровне. Всего было просмотрено около 300 клеток. В исследованных препаратах преобладали светлые пинеалоциты, являющиеся предположительно главными секреторными единицами эпифиза [9, 18].

У интактных животных (рис. 1, А) ядра светлых клеток имели диффузно распределенный хроматин и четкое ядрышко, что свидетельствует об активных транскрипционных процессах. В цитоплазме этих клеток обнаружено большое количество удлинённых митохондрий. Цистерны аппарата Гольджи не гипертрофированы (рис. 1, Б). Отсутствие секреторных гранул в отростках клеток и наличие множества микротрубочек в примембранных областях (рис. 1, В) может, по-видимому, указывать на слабую секреторную активность светлых пинеалоцитов, поскольку для секреторных клеток получены данные о существовании барьерной функции цито-

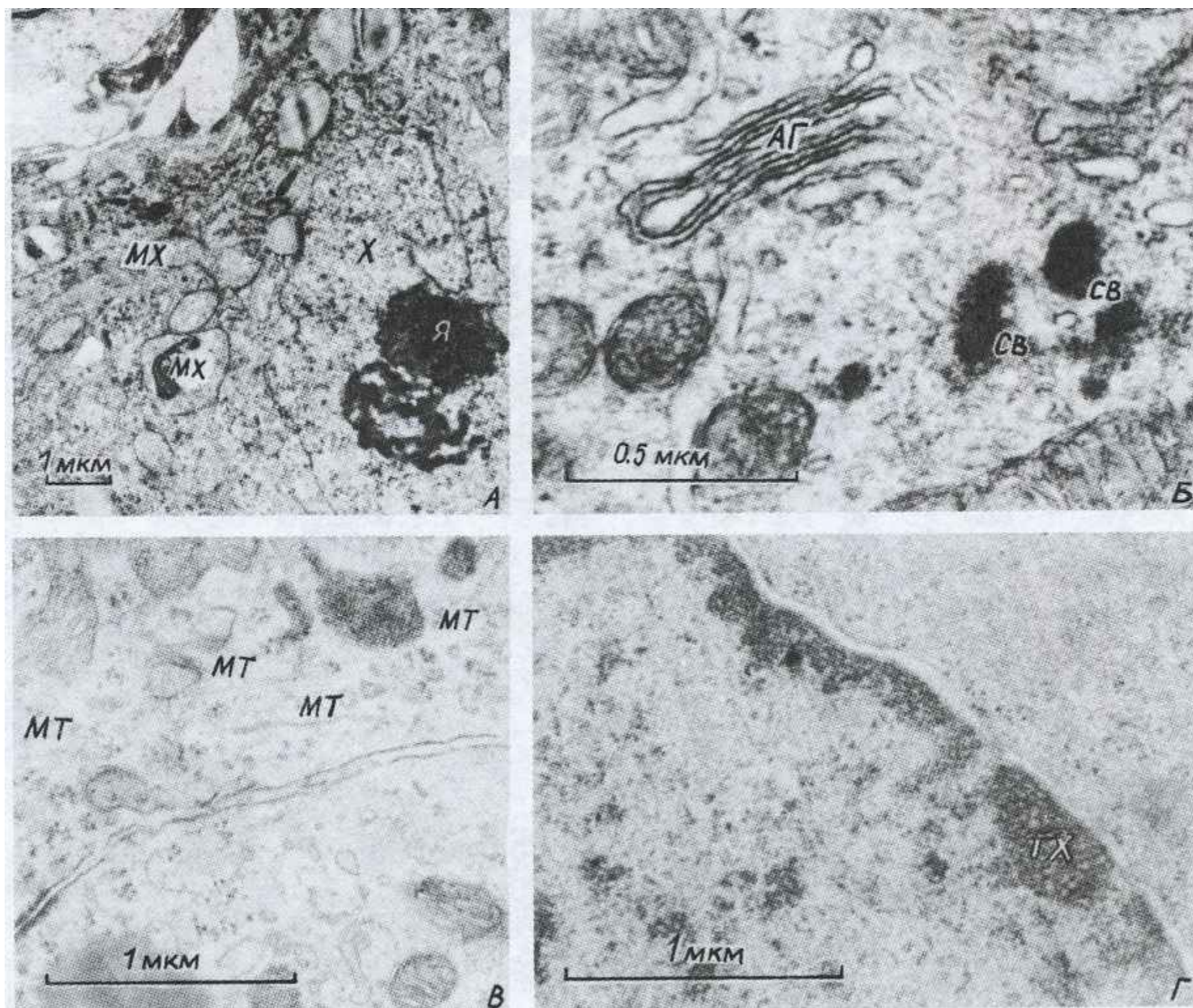


Рис. 1. Пинеалоциты интактных крыс.

А — диффузный хроматин и четкое ядрышко в светлом пинеалоците; Б — типичный аппарат Гольджи в светлом пинеалоците; В — микротрубочки в примембранной области светового пинеалоцита; Г — фрагмент темного пинеалоцита. АГ — аппарат Гольджи, ГХ — гетерохроматин, МТ — микротрубочки, МХ — митохондрии, X — хроматин, Я — ядрышко; СВ — секреторные везикулы.

скелета на стадиях, предшествующих экзоцитозу [11,17]. Темные пинеалоциты (рис. 1, Г) характеризуются еще меньшей секреторной активностью, о чем может косвенно свидетельствовать повышенная плотность ядра и совсем не выраженный цитоскелет. Как было установлено, в процессе дифференциации секреторного альвеолярного эпителия свободный пул тубулина может составлять более 80 % от его общего содержания [20].

У крыс, которые подвергались стрессу новизны на фоне 48-часовой водной и пищевой депривации (рис. 2, А—Г), в светлых пинеалоцитах были выявлены признаки активации синтеза и секреции веществ белковой природы. Для них был характерен немного более конденсированный хроматин (рис. 2, А), а также увеличение поверхности ядра, большое количество секреторных гранул (*dense cored vesicles*) в цитоплазме клетки и в межклеточных пространствах. Однако особенности цитоскелета (множество микротрубочек в районе секреторных гранул) в этих клетках (рис. 2, Б) свидетельствуют о том, что интенсивная экструзия происходила в сроки, предшествовавшие взятию материала для исследования. Наблюдалась гипертрофия цистерн аппарата Гольджи (рис. 2, В). Сильная вакуолизация митохондрий и особенности структуры их крист указывают на нарушение энергетического метаболизма в светлых пинеалоцитах при сочетанном стрессе (рис. 2, Г). Ранее сообщалось, что ответ эпифиза на стрессорное воздействие имеет двухфазный характер [1,19]. В условиях иммобилизации животных, гипогликемии, при психоэмоциональном стрессе первоначальное снижение продукции мелатонина в эпифизе сменяется фазой ее

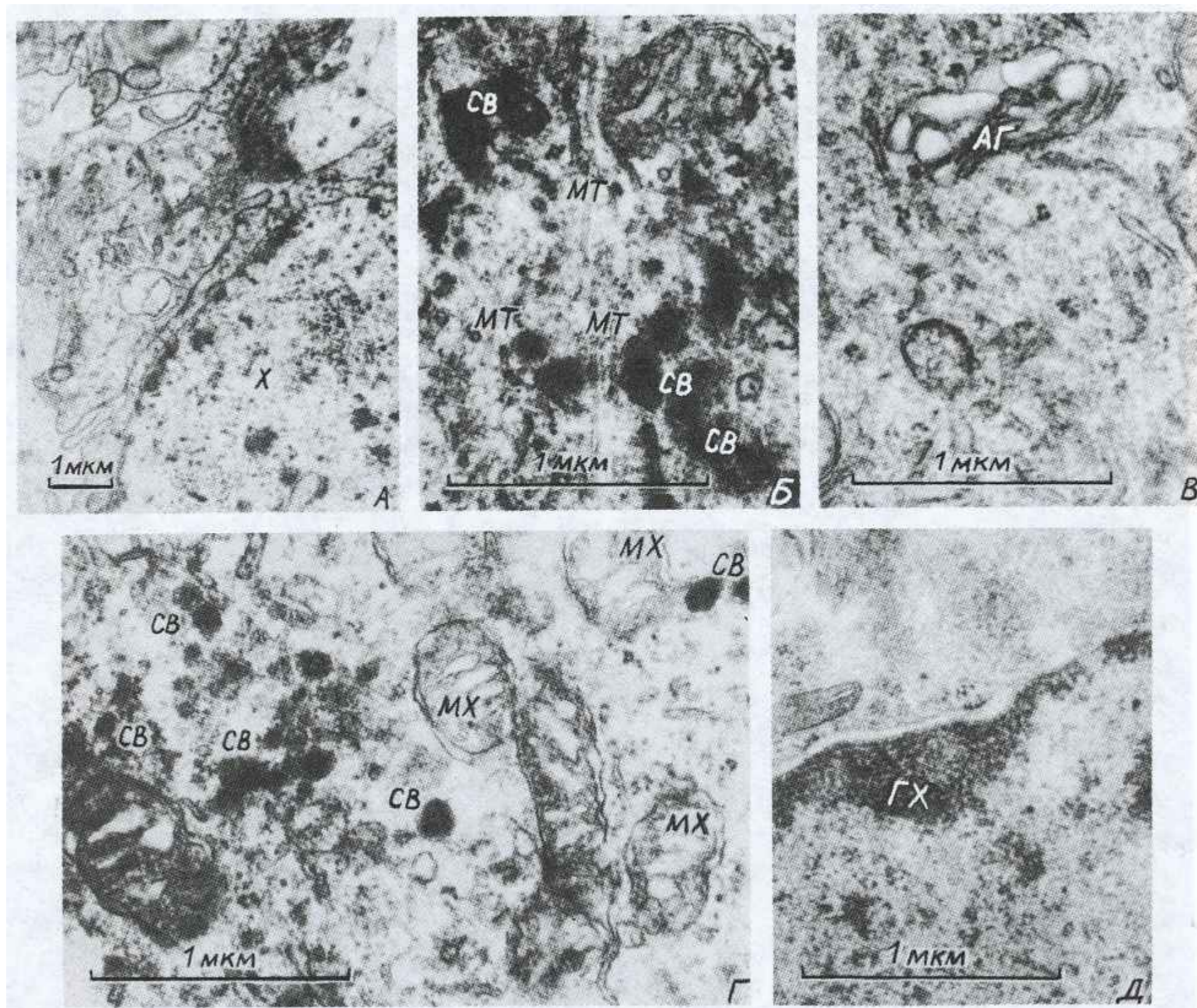


Рис. 2. Пинеалоциты крыс при стрессе (48-часовая водная и пищевая депривация плюс стресс новизны).

А — хроматин ядра светлого пинеалоцита; Б— микротрубочки в районе секреторных гранул в светлом пинеалоците; В — гипертрофия аппарата Гольджи в светлом пинеалоците; Г— нарушение структуры митохондрий в светлом пинеалоците; Д — участок ядра темного пинеалоцита. Остальные обозначения те же, что и на рис. 1.

увеличения. Для серотонина изменения имели противоположную направленность. Однако, по мнению ряда авторов, при стрессе секреторная активность пинеалоцитов сначала угнетается, а затем увеличивается [3,9]. С учетом этих данных наблюдавшиеся нами ультраструктурные изменения в пинеалоцитах соответствуют, очевидно, второй фазе стрессорного ответа.

Отличия темных клеток в эпифизе крыс, подвергнутых сочетанному стрессу, от подобных клеток у интактных животных были незначительны (рис. 2, Д). Это согласуется с данными морфологического исследования эпифиза у серебристо-черных лисиц [5], в котором в дневное время именно в светлых пинеалоцитах стрессорные изменения были выражены в большей степени. По мнению автора, подобные изменения пинеалоцитов непосредственно связаны с выделением серотонина.

Отмечая большую степень выраженности реакций светлых пинеалоцитов в наших экспериментах, следует подчеркнуть, что используемые нами модели стресса новизны и длительной пищевой и водной депривации различаются по типу стрессорного фактора. Так, в одном случае стрессорным фактором является новизна окружающей обстановки, сопровождающаяся активацией симпатoadреналовой системы, т. е. стимуляцией α_1 и β -адренорецепторов пинеалоцитов, что может приводить к снижению секреции мелатонина и повышению секреции серотонина [24]. Это, возможно, соответствует первой фазе стрессорного ответа. Вторая же фаза представляет собой реакцию на висцеральный стресс, сопровождающийся выбросом в кровь окситоцина

как у крыс, не получавших окситоцин. Это подтверждается меньшей степенью инвагинированности ядер, более деконденсированным хроматином и целостной структурой митохондрий (рис. 3, Б). В клетках выявляется множество секреторных гранул типа dense cored vesicles (в теле и в отростках) (рис. 3, А), но выброса их содержимого во внеклеточное пространство, как отмечалось у крыс, не получавших окситоцин, не наблюдается. Следовательно, левостороннее интраназальное введение окситоцина животным, подвергавшимся стрессу, не препятствует синтезу и оформлению секреторного продукта, но при этом, вероятно, приводит к подавлению его экзоцитоза.

При правостороннем введении окситоцина в условиях сочетанного стресса в светлых клетках подавлялись процессы синтеза и экстррузии (рис. 3, В). В цитоплазме большинства исследованных светлых пинеалоцитов содержится очень мало секреторных гранул типа dense cored vesicles, которые отмечались при левостороннем введении окситоцина. Хроматин ядер был сильно конденсирован (рис. 3, Г). Можно полагать, что правосторонние инфузии окситоцина подавляют секреторную активность пинеалоцитов (и синтез, и экстррузию). При обоих способах введения (право- и левостороннем) окситоцина изменений ультраструктуры темных клеток выявлено не было.

Таким образом, интраназальные введения окситоцина подавляют секреторные процессы в светлых пинеалоцитах эпифиза. Различная же право- и левосторонних эффектов проявляются только в силе эффекта.

Известно множество модуляторов синтеза мелатонина и серотонина, высвобождающихся в эпифизе из нервных терминалей [22, 23]. Среди них аденозин, ГАМК, таурин, субстанция Р, энкефалины, вазоинтестинальный пептид и другие. Результаты настоящего исследования показывают, что к их числу также может быть причислен и окситоцин.

Различия эффектов, выявленные при лево- и правостороннем введениях окситоцина в условиях сложного стресса, позволяют предполагать участие в их реализации симпатической нервной системы, представительство которой, как известно, у всех млекопитающих преобладает слева [10]. Асимметрия эффектов окситоцина может быть также связана с большим размером правой обонятельной луковицы [9], а следовательно, с различиями нисходящих право- и левосторонних ольфакторных влияний на висцеральные центры и в том числе на эпифиз.

В целом на основании полученных в работе данных представляется возможным сделать предположение, что окситоцинергические системы мозга участвуют в формировании ответа эпифиза на стрессорные воздействия, тормозя его функциональную активацию.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] Арушанян Э. Б., Арушанян Л. Г., Элькебян К. С. Место эпифизарно-адренокортикотропных отношений в поправочной регуляции поведения. Успехи физиол. наук. 24 (4) : 12—23. 1993.
- [2] Галанцев В. П., Коваленко Р. И., Камардина Т. А., Попов С. М., Январева И. Н., Перепелицина В. А. Влияние пептидов эпифиза на резистентность и состояние тканевых систем перекисного окисления липидов у крыс при асфикции и реоксигенации. Вестн. СПбГУ, сер. 3. 3 (17) : 68—77. 1995.
- [3] Коваленко Р. И. Эпифиз. В кн.: Нейроэндокринология. Ч. 1, Кн. 2. СПб. Наука. 1993.
- [4] Коваленко Р. И., Чернышева М. П., Штышук Н. В., Ноздрачев А. Д. Асимметрия периферических эффектов унилатеральных введений окситоцина у самцов белых крыс. Докл. РАН. 342 (2) : 269—272. 1995.
- [5] Колесникова Л. А. Эпифиз относительно диких и domesticированных лисиц: морфофункциональные изменения в течение суток. Физиол. журн. им. И. М. Сеченова. 82 (2) : 91—97. 1995.
- [6] Новикова И. А., Краснощекова Е. И., Коваленко Р. И., Чернышева М. П. Исследование участия в иннервации эпифиза структур симпатической нервной системы и головного

мозга у крыс. Матер. 1-го Междунар. симпоз. «Структура и функции нервной системы». Воронеж. 1995.

[7] Ноздрачев А. Д., Осипова Я. С., Чернышева М. Я. Роль окситоцина в формировании асимметрии ростральных структур головного мозга крыс в условиях осмотического стресса. Физиол. журн. им. И. М. Сеченова. 78 (2) : 269—272. 1992.

[8] Ноздрачев А. Д., Чернышева М. П., Коваленко Р. И., Осипова Н. С., Тербилова Е. А., Штылик А. В. Роль окситоцина в формировании асимметрии ростральных структур головного мозга крыс в условиях осмотического стресса. Физиол. журн. им. И. М. Сеченова. 80 (6) : 136—144. 1994.

[9] Чернышева М. П. Гормоны животных. СПб. Глаголь. 1995.

[10] Чернышева М. Я., Коваленко Р. И., Штылик А. В., Иосифова Л. Р., Люткус И. Б., Титова А. Я. Пептидные гормоны как регуляторы стрессорного ответа. Тез. докл. IV Всерос. конф. «Нейроэндокринология-95». СПб. 1995.

[11] Aunis D., Bader M. F. The cytoskeleton as a barrier to exocytosis in secretory cell. J. Exp. Biol. 139 : 253—266. 1988.

[12] Bujis R. M., Swaab D. F., Dogterom J., Van Leewen F. W. Vasopressin and oxytocin-containing fibres in the pineal gland and subcommissural organ of the rat. Cell Tissue Res. 205 (1) : 11—17. 1980.

[13] Dafny N. Evidence that the rat pineal has neuronal connections via the pineal stalk. Exp. Neurol. 79 (3) : 858—861. 1983.

[14] Hattori J. I., Morris M., Alexander N., Sunberg D. Extracellular oxytocin in the paraventricular nucleus: hyperosmotic stimulation by in vivo microdialysis. Brain Res. 250 (1) : 169—176. 1990.

[15] Iscol S., Groot L. Responses in inspiratory neurons of the dorsal respiratory group to the stimulations of expiratory muscle and vagal afferents. Brain Res. 507 (2) : 281—288. 1990.

[16] McLean J. Я., Shirley M. T. Neuroanatomical substrates of olfaction. In: Science of olfaction. N. Y. Springer. 1992.

[17] Miyamoto S. Changes in mobility of synaptic vesicles with assembly and disassembly of actin network. Biochem. Biophys. Acta. 1244: 85—91. 1995.

[18] Milin J. R. Peptidergic activity of the pineal gland in stress. In: Hormonally active brain peptides. N. Y. Plenum Press. 1981.

[19] Milin J. R. Morphodynamic response of the pineal gland to initial stress attack. Arch. d'Anat. Micr. 73 (3) : 159—180. 1984.

[20] Nickerson S. C., Ackers R. M., Weinland B. T. Cytoplasmatic organisation and quantation of microtubules in bovine mammary epithelial cells during lactation and involution. Cell. Tiss. Res. 233 : 421—430. 1982.

[21] Parkington Я. S., McCance J., Coleman H. A. Two types of cells with central innervation in pineal gland of guinea pigs. Amer. J. physiol. 252 (21) : 369—377. 1987.

[22] Reiter R. J., Stankov B. The pineal gland and its hormones. N. Y. Plenum Press. 1995.

[23] Reuss S. Components and connections of circadian timing system in mammals. Cell Tiss. Res. 285 : 353—378. 1996.

[24] Yuwiler A. Synergistic action of postsynaptic alpha-adrenergic receptor stimulation on vasoactive intestinal polypeptide-induced increases in pineal N-acetyltransferase activity. J. Neurochem. 49 : 806—811. 1987.

Поступила 22 XI 1996

После доработки 3 III 1997