

ОСОБЕННОСТИ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ПИНЕАЛОЦИТОВ У КРЫС ПРИ СТРЕССЕ В СВЕТЛОЕ ВРЕМЯ СУТОК

© Д. А. Сибаров, Р. И. Коваленко, А. Д. Ноздрачев

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

Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. Т. 86. № 8. С. 1049—1056. 2000

В дневное время проводилось электрофизиологическое исследование эпифизов крыс — интактных и подвергнутых 48-часовой водной и пищевой депривации (осмотический стресс). Анализировалась частота внеклеточно отведенных разрядов пинеалоцитов. Обнаружено наличие в эпифизе нескольких типов клеточной активности, что согласуется с результатами других исследователей. Частота разрядов пинеалоцитов у животных при стрессе была в 4—6 раз выше, чем у интактных, за счет увеличения доли «быстрых» клеток (> 5 имп/с), а также перехода части пинеалоцитов с регулярного на пачечный тип активности. Электрическая стимуляция обонятельных луковиц снижала частоту разрядов наиболее активных пинеалоцитов. Усиление электрической активности клеток эпифиза отражает увеличение интенсивности экзоцитоза клетками эпифиза веществ белково-пептидной природы и, вероятно, серотонина, но не мелатонина. Блокирование экзоцитоза колхицином выявило тесную связь секреторной активности пинеалоцитов в дневное время с их электрическими разрядами. Показано существование центральных механизмов ограничения активности пинеалоцитов со стороны, в частности, обонятельных структур.

Ключевые слова: эпифиз, пинеалоциты, электрофизиологическое исследование, осмотический стресс, секреция.

D. A. Sibarov, R. I. Kovalenko, and A. D. Nozdratchev. DAYTIME PINEALOCYTES FUNCTION DURING STRESS IN RATS. St. Petersburg State University, 199034, St. Petersburg, Universitetskaya Nab., 7/9, Russia. RUSSIAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY (formerly I.M. Sechenov Physiological Journal), 86.8, 1049—1056. 2000

Several types of unit activity were detected in the rat pineal gland during a 48-hour water and food deprivation. The unit activity rate in stress was higher by 4-6 times than in intact rats (due to an increase in the «fast» cells number and switching of some cells from regular to a burst type of activity). Electrical stimulation of olfactory epithelium decreased the unit activity rate in the most active pinealocytes. The daytime increase in the pineal electrical activity reflects an intensification of secretion of the protein/peptide substances and, probably, serotonin but not the melatonin. Blocking exocytosis with colchicin revealed a close relation of the pinealocytes secretion with their electrical activity. Existence of central (olfactory in particular) mechanisms limiting the pineal activation, was shown. Key words: pineal gland, pinealocytes, electrophysiological study, osmotic stress, secretion.

Эпифиз как фотонейроэндокринный орган модулирует активность многих физиологических систем в связи с циркадными ритмами. Он участвует в управлении адаптивными реакциями организма на изменение внешних условий среды и внутреннего гомеостаза [^{2,10,14}] Долгое время считалось, что единственной функцией эпифиза, расположенного вокруг бухты III мозгового желудочка, является сезонная и суточная модуляция деятельности репродуктивной системы. Однако более поздние исследования показали участие эпифиза в стрессорных и иммунных реакциях. Наряду с гипоталамо-гипофизарным комплексом пинеальная железа вовлекается в формиро-

вание множественных адаптационных ответов организма на стрессорное воздействие, главным образом за счет влияний со стороны краниального шейного ганглия и ЦНС в I фазу общего адаптационного синдрома и за счет действия гормонов коры надпочечников во II его фазу [1]. Показано, что под влиянием страха, шума, вибрации, иммобилизации, гипергликемии, отсадки потомства у лактирующих животных, принудительного купания в холодной воде усиливается продукция эпифизом мелатонина и веществ пептидной природы [1,2]. В частности, мелатонин (основной гормон эпифиза) ослабляет негативное воздействие на организм окислительного, осмотического, психического и других видов стресса [1,2]. Этот нейрогормон также обладает антиканцерогенными свойствами и может модулировать функции иммунной системы [7,18]. Выделенные из ткани эпифиза пептиды проявляют сходные с мелатонином эффекты. Пептидные препараты эпифиза способны повышать функциональную активность тимуса, нормализовать ряд нарушений углеводного и жирового обмена, обладают антиокислительными свойствами [3,9]. Нами сообщалось [5], что при осмотическом стрессе происходит активация синтеза и экскреции веществ белково-пептидной природы одним из типов клеток эпифиза — светлыми пинеалоцитами.

Известно, что микроэлектродная регистрация потенциалов действия позволяет оценить уровень секреторной активности пинеалоцитов, поскольку деполяризация нейросекреторных клеток коррелирует с экзоцитозом [4,16]. В связи с тем что жирорастворимый мелатонин способен диффундировать через клеточную мембрану, его секрета, по-видимому осуществляется не путем выведения секреторных везикул и, следовательно, напрямую не связана с деполяризацией мембраны. Это, в частности, подтверждается следующими наблюдениями. Подавление потенциалов действия пинеалоцитов с помощью Ca^{2+} -связывающих веществ — верапамила или нифедипина — не оказывает существенного влияния на продукцию мелатонина [13], а угнетение активности N-ацетилтрансферазы (фермента, катализирующего синтез мелатонина) не влияет на электрическую активность пинеалоцитов. Полагают, что секрета эпифизарных пептидов осуществляется обычным экзоцитозом.

Целью данной работы была проверка ранее полученных нами данных об активации пинеалоцитов при осмотическом стрессе при помощи методики регистрации частоты их деполяризации. Кроме того, одной из задач явилось изучение влияния на эпифиз со стороны обонятельной системы, поскольку у крыс она имеет даже большее значение, чем зрительная.

МЕТОДИКА

Объектом исследования служили 16 белых крыс-самцов линии Вистар с массой тела 160—180 г, содержащихся в виварии СПбГУ при естественном освещении. Опыты проводили в светлое время суток 12:00—13:00. Контролем служили 4 интактных животных, имевших свободный доступ к воде и пище. Крыс опытной группы ($n = 12$) подвергали 48-часовой водной и пищевой депривации. Электрическую активность клеток оценивали при помощи микроэлектродной регистрации разрядов пинеалоцитов. Наркотизированных уретаном крыс (1.1 г/кг массы тела, внутривенно) помещали в стереотаксический прибор. Производили удаление фрагмента кости черепа (диаметром 5 мм) в области брегмы, перевязывали венозный синус. Внеклеточную регистрацию биопотенциалов осуществляли при помощи заполненного 3 М NaCl стеклянного микроэлектрода (диаметр кончика 10—30 мкм, сопротивление 4—6 МОм). Сигнал с микроэлектрода усиливали и затем оцифровывали при помощи звуковой платы «Sound-Blaster 16» под управлением программы «Cool-Edit Pro». После записи спонтанной клеточной активности эпифиза каждую крысу подвергали электрической стимуляции обонятельного эпителия при помощи двух серебряных биполярных электродов, которые вводили в носовые ходы на глубину 5—6 мм (параметры раздражающего тока: 40 В, 100 Гц, 50 мс в течение 15 с). Микроэлектродную регистрацию разрядов пинеалоцитов производили непрерывно до, во время и после стимуляции. В двух отдельных экспериментах для выяснения связи между электрической активностью клеток и экзоцитозом секреторных гранул в микроэлектродный раствор добавляли колхицин в концентрации 0.01 М, блокирующий разборку микротрубочек и процессы экзоцитоза в клетке.

Статистическая обработка включала программный поиск отдельных разрядов в мультиклеточной записи и идентификацию разрядов отдельных клеток в разработанной нами программе «SMP 5.0» следующими способами: построение гистограммы распределения амплитуд отдельных разрядов; разделение разрядов по полярности; построение совместного распределения по амплитуде, продолжительности де- и реполяризации; вычисление автокорреляционной функции для поиска периодических процессов и зависимостей между разрядами клеток; наложение множества периодических промежутков равной длины для выявления периодических процессов; поиск межклеточных взаимодействий путем наложения множества промежутков, начинающихся разрядом с заданными параметрами, для выявления отвечающих на него разрядов других клеток.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе экспериментов обнаружены «медленный», с частотой разрядов < 2 имп/с, и «быстрый», с частотой разрядов > 4 имп/с, типы активности пинеалоцитов. «Медленный» тип был представлен регулярными, нерегулярными и пачечными разрядами (рис. 1). Электрофизиологические параметры активности клеток у интактных и подвергнутых осмотическому стрессу животных представлены в таблице. В эпифизе интактных крыс наблюдался, как правило, только «медленный» тип активности (частота 0.86 ± 0.49 имп/с, регулярно и нерегулярно разряжающиеся клетки), что свидетельствует о невысокой секреторной активности эпифиза у интактных животных.

Ранее мы сделали тот же вывод на основании электронно-микроскопических исследований, в которых оценивался объем везикул различной природы в эпифизе интактных крыс [8]. В опытах с добавлением в микроэлектродный раствор колхицина, блокирующего разборку микротрубочек и в результате этого останавливающего процессы экзоцитоза в пинеалоцитах, мы получили снижение электрической активности клеток, прилежащих к кончику микроэлектрода. Это наблюдение свидетельствует о существовании связи разрядов пинеалоцитов с выбросом ими секреторных гранул.

Регистрация разрядов пинеалоцитов у крыс, подвергавшихся осмотическому стрессу, выявила клетки с пачечным типом активности, отсутствовавшие у интактных животных (рис. 2). Переход при стрессе части клеток с «медленным» типом активности с регулярного на пачечный тип разрядов приводил к увеличению суммарной частоты разрядов в 4—6 раз. Кроме того, появлялся «быстрый» тип активности (5.7 ± 0.73 имп/с).

Сделанное нами предположение о переключении части пинеалоцитов с регулярного на пачечный тип активности подтверждается следующими наблюдениями: обратимостью перехода с регулярного на пачечный тип разрядов отдельных клеток; переменным числом разрядов в пачке; близостью частот разрядов и частот пачек у клеток с «медленным» типом активности, а также близостью продолжительности отдельных разрядов у пачечно и регулярно разряжающихся клеток. Наши данные о существовании нескольких типов разрядов пинеалоцитов согласуются с наблюдениями С. Reyes-Vazquez с соавт. [20]. Эти наблюдения о существовании нескольких типов клеток представляются весьма интересными, так как долгое время в эпифизе различали только два типа пинеалоцитов — «светлые» и «темные». Недавно с помощью световой микроскопии идентифицировано большее число типов клеток: светлые, темные, промежуточные и гранулярные [6]. По мнению автора, принадлежность клетки к определенному типу определяется ее текущим функциональным состоянием. Пинеалоциты с регулярным, нерегулярным и пачечными типами разрядов изучались многими авторами [п. 19, го] и было установлено, что продолжительность отдельных разрядов может варьировать от 1 до 200 мс. Последнее значительно облегчает идентификацию разрядов отдельных клеток по форме при мультиклеточном отведении.

Соотношение пинеалоцитов с вышеуказанными типами активности различалось у интактных и подвергнутых осмотическому стрессу крыс (рис. 3). Основная часть клеток интактных животных (91 %) была представлена редко разряжающимися «ре-



Рис. 1. Примеры спонтанной активности пинеалоцитов.

А — мультиклеточная активность, *Б* — «медленный» регуляторный тип разрядов у интактных крыс, *В* — «быстрый» тип разрядов у крыс при стрессе, *Г* — пачечные разряды клеток при стрессе. Калибровка: 1 с.

Сравнительная характеристика клеток с различным типом активности
в эпифизе депривированных и интактных животных

Тип активности	Интактные	Депривированные
«Медленный» (частота разрядов <2 имп/с)	Регулярная одиночная активность (0.86 ± 0.49 Гц) и нерегулярные разряды Обычно отсутствует	Регулярная пачечная активность (1.43 ± 0.35 пачек/с; 4—6 спайков в пачке) и просто регулярные разряды Регулярные разряды (5.71 ± 0.73 Гц), иногда короткими пачками по 2—3 спайка в пачке
«Быстрый» (частота разрядов >5 имп/с)		

гулярными» и «нерегулярными» клетками, а при осмотическом стрессе возрастала доля пинеалоцитов с «пачечным» и «быстрым» типами активности, что приводило к росту суммарной частоты разрядов. Одновременное 3-кратное снижение числа «регулярных» и 6.5-кратный рост числа «пачечных» клеток также указывают на переключение клеток на пачечный тип разрядов. Последнее вместе со снижением числа медленно разряжающихся «нерегулярных» клеток и появлением пинеалоцитов с «быстрым» типом активности указывает на интенсификацию экзоцитоза в эпифизе у животных, подвергавшихся осмотическому стрессу. Наблюдаемую активацию секреторных процессов в клетках эпифиза можно объяснить тем, что увеличение осмолярности крови в капиллярах эпифиза, вызванное 48-часовой водной и пищевой депривацией, сопровождается усилением выхода воды из его клеток. Выход воды из пинеалоцитов вместе с секреторными продуктами, возможно, происходит в результате увеличения в крови концентрации глюкокортикоидных гормонов, характерного для II стадии общего адаптационного синдрома. Как известно, последние подавляют секрецию инсулина, что приводит к увеличению содержания глюкозы в крови и повышению ее осмолярности [10]. Кроме того, пинеалоциты имеют рецепторы к глюкокортикоидам, активация которых приводит к усилению секреторных процессов в клетках [2].

В условиях активации электрических процессов в эпифизе у депривированных животных нам удалось наблюдать группы взаимодействующих пинеалоцитов (рис. 4). Внешне активность такой группы напоминает пачку, но клетки различаются по форме спайков и разряжаются в строгой последовательности с различными, но постоянными задержками между спайками. Подобные межклеточные взаимодействия, возможно, обеспечивают активацию и синхронную деятельность целой группы пинеалоцитов за счет существования плотных [15] и щелевых [8] межклеточных контактов.

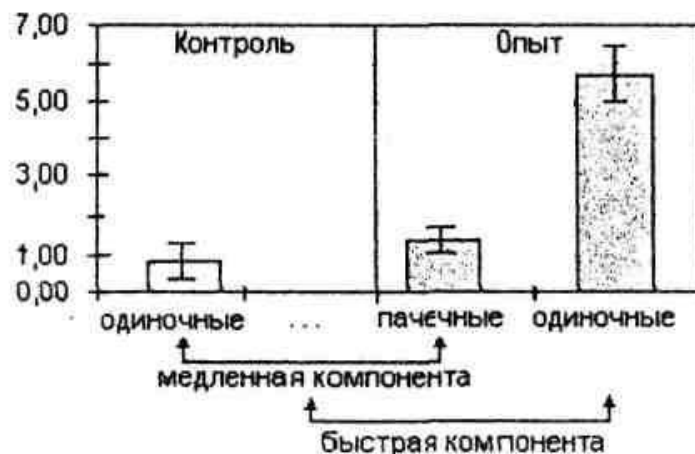


Рис. 2. Частоты разрядов спонтанно активных клеток эпифиза у интактных и подвергнутого стрессу крыс.

По вертикали — разряды, имп/с.

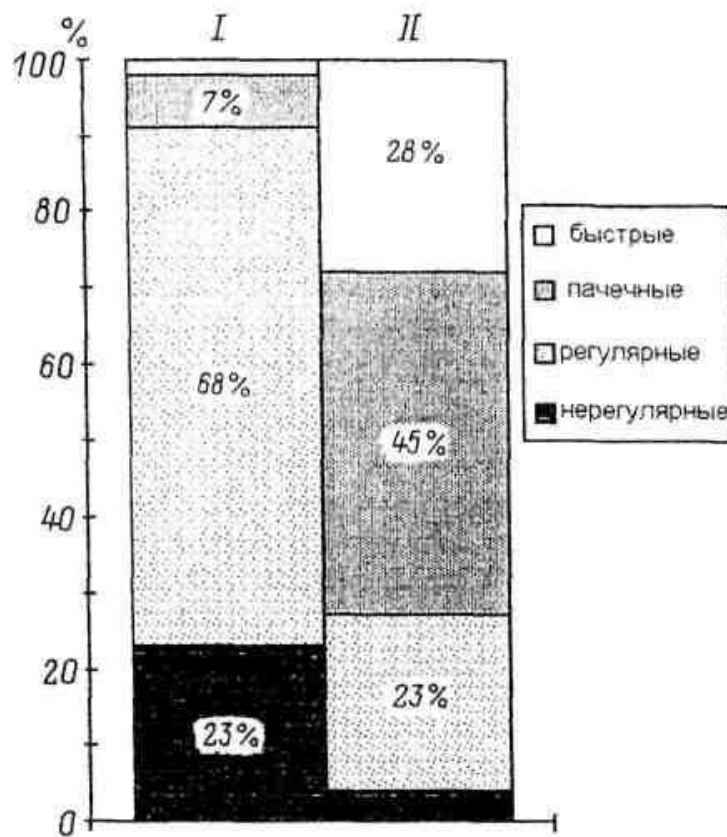


Рис. 3. Соотношение клеток с различными типами разрядов у интактных и подвергнутых осмотическому стрессу крыс.

I — интактные крысы, II — стресс. По вертикали — общее число клеток, %.

Прямые эфферентные нервные связи обонятельных структур с эпифизом были продемонстрированы многими методами. Например, после разрушения хабенулярного ядра в эпифизе выявлялись дегенерирующие нервные волокна [21]. Еще более убедительно такие связи были показаны в электрофизиологических [121] и гистохими-

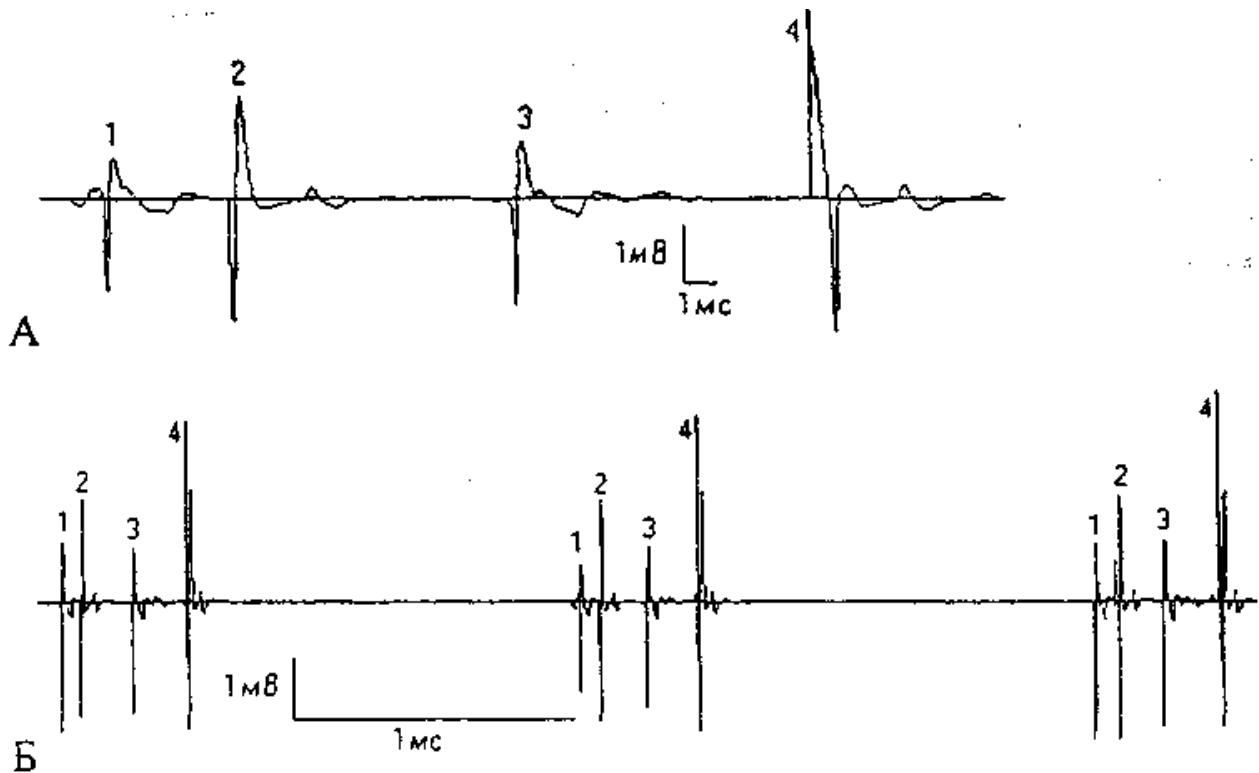


Рис. 4. Группа из 4 взаимодействующих клеток у крыс при осмотическом стрессе.

A — постоянные интервалы 1—2, 2—3, 3—4 и 4—1 между разрядами; B — различия амплитуды, формы и полярности разрядов. Неравная длина интервалов — 1—2, 2—3 и 3—4.

ческих [12-22] работах. Даже полная симпатэктомиа эпифиза не блокирует вызванные потенциалы в пинеалоцитах при электростимуляции габенул. Нами обнаружено, что электрическая стимуляция обонятельного эпителия приводит к достоверному снижению суммарной частоты разрядов клеток эпифиза на 58 % у депривированных и на 45 % у интактных крыс. Главным образом при стимуляции обонятельного эпителия снижалась частота разрядов «медленных» пинеалоцитов. Клетки с «быстрым» типом активности на нее практически не реагировали. Это еще раз подтверждает положение о гетерогенности клеточных популяций пинеалоцитов в эпифизе и говорит о том, что обонятельный сенсорный вход контролирует деятельность только части клеток эпифиза.

В целом нами впервые получены данные об активации части клеток эпифиза в дневное время у крыс при осмотическом стрессе, обнаружена ранее не описанная в литературе взаимная активация пинеалоцитов путем межклеточных взаимодействий. Показано также ограничивающее влияние на частоту разрядов наиболее активных пинеалоцитов со стороны обонятельных структур.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] Анисимов В. Н. Физиологические функции эпифиза (геронтологический аспект). Физиол. журн. им. И. М. Сеченова. 83 (8) : 1—13.2 1997.
- [2] Арушанян Э. Б., Арушанян Л. Г., Элькебян К. С. Место эпифизарно-адренорепродуктивных отношений в поправочной регуляции поведения. Успехи физиол. наук. 24 (4) : 12—23. 1993.
- [3] Галанцев В. П., Коваленко Р. И., Камардина Т. А., Попов С. М., Январева И. Н., Перепелица В. А. Влияние пептидов эпифиза на резистентность сердца и состояние тканевых систем перекисного окисления липидов у крыс при асфиксии и реоксигенации. Вести. СПбГУ. Сер. 3. 3 (17) : 68—78. 1995.
- [4] Глебов Р. Н. Эндцитоз и экзоцитоз. М. Высш. школа. 1987.
- [5] Коваленко Р. И., Сибаров Д. А., Павленко И. Н., Лукьянова Е. Л. Структура пинеалоцитов крысы при стрессе и после унилатеральных интраназальных введений окситоцина. Физиол. журн. им. И. М. Сеченова. 83 (8) : 78—93. 199.
- [6] Колесникова Л. А. Эпифиз у относительно диких и доместичированных лисиц: морфофункциональные изменения в течение суток. Физиол. журн. им. И. М. Сеченова. 82 (2) : 91—97. 1995.
- [7] Морозов В. Г., Хавинсон В. Х. Пептидные биорегуляторы (25-летний опыт экспериментального и клинического изучения). СПб. Наука 1996.
- [8] Скопичев В. Г., Коваленко Р. И., Селиверстов Ю. А. Изменение ультраструктуры пинеалоцитов крысы в отдаленные сроки после гипофизэктомии. Цитология. 29 (5) : 516—520. 1987.
- [9] Слепушкин В. Д., Пашинский В. Г. Эпифиз и адаптация организма. Томск. Изд-во Том. ун-та. 1982.
- [10] Чернышева М. П. Гормоны животных. СПб. Глаголь 1995.
- [11] Demaine C, Semm P. Electrophysiological evidence for central nervous connections of the pigeon's pineal gland. Brain Res. Bull. 13 (5) : 629—634. 1984.
- [12] Jimenez A. J., Fernandez-Llebrez P., Perez-Figares J. M. Central projections from the goldfish pineal organ traced by HRP-immunocytochemistry. Histol. Histopathol. 10 (4) : 847—852. 1995.
- [13] McCance I., Parkington H. C, Coleman H. A. The association between melatonin production and electrophysiology of the guinea pig pineal gland. J. Pineal Res. 21 (2) : 79—90. 1996.
- [14] Milin J. R. Morphodynamic response of the pineal gland to initial stress attack. Arch. d'Anat. Micr. 73 (3) : 159—180. 1984.
- [15] Kunwar P. The ultrastructure of mammalian pinealocytes: a systematic investigations. Micr. Res. Techn. 21 : 85—115. 1992.
- [16] Nordmann J. J. Stimulus — secretion coupling. Progr. Brain. Res. 60 : 283—303. 1983.
- [17] Parkington H. C, McCance I., Coleman H. A. Two types of cells with central innervation in pineal gland of guinea pigs. Amer. J. Physiol. 252 : 369—377. 1987.
- [18] Reiter R. J., Melchiorri D., Sewerinek E., Poeggler B., Barlow-Walden L., Chuang J., Ortiz G. G., Acuana-Castroviejo D. A. Review of the evidence supporting melatonin's role as an antioxidant. J. Pineal Res. 68 : 1—11. 1995.

[19] *Reuss S., Semm P., Vollrath L* Changes in the electrical activity of the rat pineal gland following stimulation of the cervical sympathetic ganglia. *J. Autonom. Nerv. Syst.* 12 (4) : 281—288. 1985.

[20] *Reyes-Vazquez C, Prieto-Gomez B., Aides L. D., Dafny N.* Rat pineal exhibits two electrophysiological patterns of response to microiontophoretic norepinephrine application. *J. Pineal Res.* 3 (3) : 213—222. 1986.

[21] *Ronnekleiv O. K., Kelly M. J., Wurrke W.* Single unit recordings in the rat pineal gland: evidence for habenular-pineal neural connections. *Exp. Brain Res.* 39 : 187—192. 1980.

[22] *Yanez J., Anadon R.* Afferent and efferent connections of the habenula in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): an indocarbocyanine dye (Dil) study. *J. Сотр. Neurol.* 372 (4) : 529—543. 1996.

Поступила 4 II 2000