

УДК 576.54+591.5

ВЛИЯНИЕ ПЕПТИДОВ ЭПИФИЗА НА СПОНТАННУЮ ЭЛЕКТРИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ПИНЕАЛОЦИТОВ КРЫС

© 2002 г. Д. А. Сибаров, Р. И. Коваленко, академик А. Д. Ноздрачев,
В. В. Калинин, В. Х. Хавинсон

Поступило 11.04.2002 г.

Известно, что пептиды эпифиза обладают иммуномодулирующими, стресс-протекторными, антиоксидантными и многими другими свойствами [1, 4]. Наблюдаемые эффекты имеют центральную и периферическую природу. При системном введении проникновению этих веществ в ЦНС в значительной степени препятствует гематоэнцефалический барьер. Неинвазивным способом доставки пептидных веществ в ЦНС являются интраназальные инфузии, при которых вещества могут: 1) связываться с рецепторами слизистой оболочки носовой полости и вызывать немедленные эффекты в ЦНС; 2) проникать в мозговой кровотоки и попадать в ЦНС в районе циркувентрикулярных органов, к которым принадлежит и эпифиз; 3) захватываться окончаниями аксонов, приходящих из ЦНС в слизистую оболочку носа, и попадать в мозговые структуры с аксональным транспортом; 4) диффундировать в ликвор через подпаутинное пространство обонятельных трактов [5]. Установлено, что частота деполяризации пинеалоцитов пропорциональна интенсивности выброса ими везикул с пептидным содержанием [2, 6, 7], что позволяет судить об интенсивности секреторных процессов в пинеалоцитах. Для понимания механизмов саморегуляции эпифиза представляет несомненный интерес изучение возможности воздействия пептидных препаратов эпифиза на секреторную активность самой железы. В связи с этим целью настоящей работы стало исследование влияния эпиталамина, эпиталона и окситоцина при интраназальном введении на спонтанную электрическую активность пинеалоцитов крыс.

У наркотизированных уретаном крыс-самцов Вистар (1.1 г/кг массы тела, внутрибрюшинно) удаляли фрагмент кости черепа диаметром 5 мм в

*Санкт-Петербургский государственный
университет*

*Санкт-Петербургский институт биорегуляции
и геронтологии
Российской Академии медицинских наук*

области брегмы и перевязывали венозный синус для предотвращения кровотечения. Внеклеточная регистрация биопотенциалов проводилась при помощи стеклянного микроэлектрода, заполненного 3М NaCl (диаметр кончика 10-30 мкм, сопротивление 1-2 МОм). Сигнал с микроэлектрода усиливался в 100 раз, оцифровывался звуковой платой "Opti 931" под управлением программы "Cool-Edit Pro" ("Syntrillium Inc.", США) и обрабатывался разработанной нами программой (SMP v 5.0), определяющей частоты и характер разрядов отдельных клеток, а также проводящей их первичную статистическую обработку ($P < 0.05$) [7]. Одновременно с микроэлектродной регистрацией крысам билатерально интраназально вводили растворы следующих пептидных препаратов: эпиталамин в дозе 10 мкг/крысу - 50 мкл ($n = 4$), эпиталон в дозе 0.5 мкг/крысу - 50 мкл ($n = 8$) и окситоцин в дозе 0.5 мкг/крысу - 50 мкл ($n = 3$).

Эпиталамин - полипептидный препарат, выделенный методом уксуснокислой экстракции из эпиталамо-эпифизарной области головного мозга [1] (ООО "Самсон-Мед", Санкт-Петербург).

Эпиталон - синтетический тетрапептид (Ala-Glu-Asp-Gly), сконструированный на основе анализа аминокислотного состава эпиталамина [3] в Санкт-Петербургском институте биорегуляции и геронтологии СЗО РАМН.

Окситоцин - H-Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Leu-Gly-NH₂ ("Sigma").

В качестве контроля применяли физиологический раствор - 50 мкл ($n = 3$).

Влияние эпиталона на электрическую активность пинеалоцитов изучали также в опытах *in vitro* ($n = 6$). Эпифиз быстро (30 с) извлекали из тела наркотизированного уретаном животного и помещали в ванночку с аэрируемым физиологическим раствором при температуре 37°C. Эпиталон добавляли в ванночку с эпифизом в процессе опыта в количестве, достаточном для создания в инкубационной среде концентрации препарата 10⁻⁷ моль/л. Через 10-15 мин инкубационную среду в ванночке меняли, удаляя препарат, и через 15 мин опыт повторяли. Регистрацию электрической

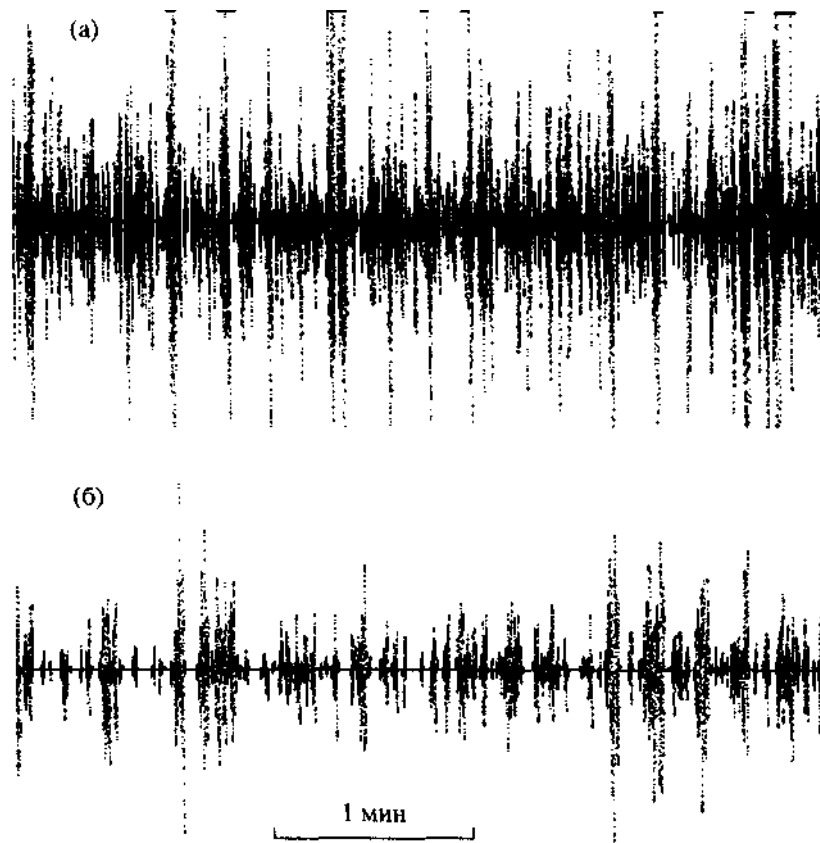


Рис. 1. Примеры записей мультиклеточной активности пинеалоцитов до (а - intactные) и после (б - через 5 мин) интраназального введения эпیتالона (опыт *in vivo*).

кой активности пинеалоцитов проводили аналогично опытам *in vivo*.

Интраназальное введение физиологического раствора *in vivo* вызывало немедленное кратковременное (1-1.5 мин) неспецифическое усиление электрической активности эпифиза, обусловленное его нервными связями с обонятельными структурами. Микроэлектродная регистрация разрядов пинеалоцитов выявила неравнозначное влияние интраназального введения эпیتالона на пинеалоциты с различным типом активности. Начало действия эпیتالона наблюдалось через 6-8 мин после инфузии. Эпیتالон снижал на 35-40% частоту редко разряжающихся клеток (0.05-0.01 имп/с) с нерегулярным типом активности и в среднем на 25% частоту разрядов более часто разряжающихся клеток (2.0-0.4 имп/с) с регулярным типом активности (рис. 1). Продолжительность эффектов варьировала, но в большинстве опытов составляла 3-4 мин. Интраназальное введение эпیتالона приводило к достоверному 30%-ному снижению частоты разрядов всех типов пинеалоцитов через 5-8 мин после введения. Эффект был непродолжителен и через 20-25 мин после инфузии электрическая активность эпифиза возвращалась к исходным

значениям. Интраназальное введение окситоцина оказывало небольшой (20-30%) подавляющий эффект на суммарную частоту разрядов пинеалоцитов, но этот эффект наблюдался только у части животных. Вероятно, временная задержка действия препаратов связана со временем их проникновения в мозговые структуры.

В опытах *in vitro* также наблюдалось неравнозначное действие эпیتالона на пинеалоциты с различным типом активности. Добавление в ванночку с эпифизом эпیتالона приводило к 80-90%-ному подавлению частоты разрядов клеток с нерегулярным типом активности, но не влияло на периодически разряжающиеся клетки с пачечными разрядами (рис. 2).

Электрическая активность пинеалоцитов, регистрируемая в светлое время суток, по всей видимости, связана с продукцией железой веществ белково-пептидной природы [2, 6]. Мы полагаем, что задержка начала действия эпیتالона при интраназальном введении определяется временем его транспорта из носовой полости в мозговые структуры. Кроме того, сходство эффектов эпیتالона при интраназальном введении и при прямой аппликации на эпифиз *in vitro* позволяет

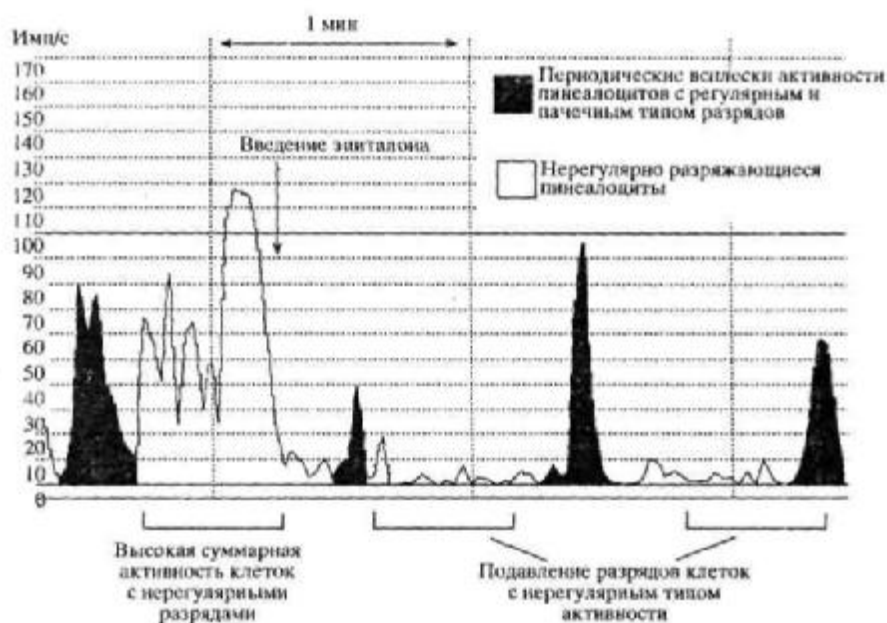


Рис. 2. Пример частотной диаграммы суммарной электрической активности различных типов пинеалоцитов при действии эпیتالона *in vitro*. При действии эпیتالона происходит подавление активности популяции клеток только с нерегулярным типом разрядов.

предполагать, что при интраназальном введении препарат действительно достигает эпифиза и его эффекты не опосредованы через другие мозговые структуры. Чрезвычайно низкие физиологически активные концентрации эпیتالона и идентичность его действия на эпифиз в опытах *in vivo* и *in vitro* позволяют предположить существование рецепторов к этому пептиду в самом эпифизе, однако этот вопрос нуждается в дальнейшей разработке. При интраназальном введении установлены специфические и неспецифические эффекты исследованных пептидов на эпифиз. Неспецифическое действие проявляется немедленно после введения препарата и обеспечивается нервными связями эпифиза с обонятельными структурами. Специфическое действие проявляется через 5-8 мин после инфузии и вызывается проникновением введенных веществ в эпифиз и другие структуры ЦНС. Влияние эпیتالона, эпیتالона и окситоцина на электрическую активность железы было преимущественно тормозным и касалось только популяции редко разряжающихся малоактивных пинеалоцитов, в которых, по-видимому, не происходит выброс секреторных гранул. Таким образом, некоторые вещества белково-пептидной природы, вырабатываемые эпифизом, помимо разнообразных гормональных

эффектов в организме могут осуществлять регуляцию секреторных процессов в железе по механизму коротких отрицательных обратных связей в чрезвычайно низких физиологических концентрациях.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Морозов В.Т., Хавинсон В.Х. Пептидные биорегуляторы: (25-летний опыт экспериментального и клинического изучения). СПб.: Наука, 1996. 74 с.
2. Сибаров Д.А., Коваленко Р.И., Ноздрачев А.Д. // Росс, физиол. журн. 2000. Т. 86. № 8. С. 1049-1052.
3. Хавинсон В.Х. Тетрапептид, обладающий герпротекторной активностью, фармакологическое средство на его основе и способ его применения. Пат. РФ №2157233. 2000.
4. Хавинсон В.Х., Морозов В.Т. Пептиды эпифиза и тимуса в регуляции старения. СПб.: Фолиант, 2001. 160 с.
5. Chen X., Fawcett R.F., Rahman Y.-E. et al. // J. Alzheimer's Disease. 1998. № 1. P. 35-44.
6. McCance I., Partington H.C., Coleman H.A. // J. Pineal Res. 1996. V. 21. № 2. P. 79-90.
7. Sibarov D.A., Kovalenko R.I., Anisimov V.N., Nozdachev A.D. // Neuroendocr. Lett. 2000. № 21. P. 307-312.