

◆ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЭНДОКРИНОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2004

УДК 616.831.45-02:613.863]-008.9-074-092.9

Д. А. Сибаров¹, Р. И. Коваленко¹, С. В. Шатик², А. Д. Ноздрачев³**ИНДОЛЬНЫЕ И ОЛИГОПЕПТИДНЫЕ ФРАКЦИИ ТКАНИ ЭПИФИЗА КРЫСЫ ПРИ ОСМОТИЧЕСКОМ СТРЕССЕ**

Кафедра общей физиологии (зав. — акад. А. Д. Ноздрачев) Санкт-Петербургского государственного университета¹, лаборатория нейробиологии интегративных функций мозга (зав. — проф. В. М. Клименко) Института экспериментальной медицины РАМН², лаборатория физиологии рецепции Института физиологии им. И. П. Павлова РАН³

Рассматривается пептидообразование в эпифизе в светлое время суток, когда метаболическая активность пинеалоцитов, связанная с синтезом индоламинов (мелатонина), невелика, и изменения секреции железой других веществ, в частности пептидной природы, выходят на первый план. Высокая стрессозащитная активность пептидных гормонов эпифиза и успешный опыт их клинического применения делают весьма перспективным исследование вовлечения эпифиза наряду с гипоталамо-гипофизарной системой в общий адаптационный синдром. Проведено исследование пептидных экстрактов эпифиза интактных и подвергнутых 48-часовой водной и пищевой депривации крыс методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. При стрессе обнаружено увеличение продукции железой серотонина, связываемое нами со снижением активности N-ацетилтрансферазы под действием кортикостерона, а также увеличение фракции гидрофильных высокомолекулярных пептидов. Кроме того, в эпифизе при стрессе зарегистрировано увеличение содержания вазопрессина, что, вероятно, может иметь регуляторное значение.

Ключевые слова: эпифиз, стресс, пептиды, мелатонин, серотонин.

The paper deals with peptide formation in the epiphysis during daylight hours when the metabolic activity of pinealocytes, which is associated with the synthesis of indolamines (melatonin), is not high, and the changes in this gland's secretion of other agents, particularly those of peptide nature are in the foreground. The high stress-protective activity of epiphyseal peptide hormones and the successful experience in their clinical use made a study of the involvement of the epiphysis, along with the hypothalamopituitary system, into the common adaptation syndrome highly promising. The epiphyseal peptide extracts from intact rats and from the rats exposed to 48-hour water and food deprivation were studied, by using high performance liquid chromatography. Under stress, there was a higher epiphyseal serotonin production, which was associated by the authors with the corticosterone-induced decrease in the activity of N-acetyl transferase, as well as an increase in the fraction of high molecular-weight peptides. Moreover, the elevated levels of vasopressin were recorded in the epiphysis under stress, which is likely to be of regulatory value.

Key words: epiphysis, stress, peptides, melatonin, serotonin.

Гормонам эпифиза посвящено множество научных публикаций, однако большинство из них касается мелатонина, максимум секреции которого наблюдается в темное время суток. В литературе преобладает мнение о том, 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 и другие вещества, среди которых особый интерес в силу их высокой биологической активности представляют пептиды [9, 11]. Несмотря на успешное применение в клинике пептидных препаратов эпифиза, в частности эпитамина, для коррекции иммунных, онкологических и эндокринных патологий [9], пептидам по сравнению с мелатонином посвящено непропорционально мало работ. Чрезвычайно скудны сведения о циркадном ритмике их секреции. Именно поэтому весьма актуально изучение пептидообразования в железе в светлое время суток, когда метаболическая активность пинеалоцитов, связанная с синтезом индоламинов (мелатонина), невелика, и изменения секреции пептидных гормонов и серотонина выходят на первый план.

Эпифиз наряду с гипоталамо-гипофизарным комплексом вовлекается в формирование множественных адаптационных ответов организма на

стрессовое воздействие, главным образом за счет влияний со стороны верхнего шейного симпатического ганглия и ЦНС в I фазу общего адаптационного синдрома и за счет действия кортикотропина во II его фазу [1]. 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 [2, 3]. Многие эффекты гормонов эпифиза проявляются только при стрессе и выражаются в противодействии стрессорным повреждениям. Как известно, удаление эпифиза мало сказывается на жизнеспособности организма, но только до тех пор, пока последний не подвергается какому-либо стрессовому воздействию. На основании этих данных высказано предположение о том, что эпифиз обеспечивает включение стрессреализующих и стресслимитирующих механизмов, а в норме его регуляторные влияния на организм невелики [1].

Химическая структура большинства пептидов эпифиза не установлена. К идентифицированным, частично очищенным пептидам железы относятся антигонадотропин (2 и 10 кД), вазотонин, окситоцин и вазопрессин. Пептидный фактор 1200 Д, выделенный из эпифиза, специфически регулирует

транскрипцию ДНК в клетках [14]. Вещества белковой и пептидной природы, секретируемые пинеалоцитами в ответ на некоторые экстремальные воздействия, возможно, также участвуют в формировании стрессовой реакции организма. Известно, что пептидный препарат эпифиза кринофизин предотвращает гипергликемию, вызываемую введением норадреналина [12]. Инъекции пептидного препарата эпиталамина сопровождалась антистрессорными эффектами [2, 8].

Существование цитомединов — класса пептидных биорегуляторов, осуществляющих связь между малыми группами клеток и оказывающих значительное влияние на их специфическую активность, было показано довольно давно [5, 6, 9]. Цитомедины переносят от клетки к клетке определенную информацию, содержащуюся в последовательности аминокислот и конформационных модификаций. Наибольший эффект цитомедины дают в тканях того органа, из которого они выделены [4]. Тимус и эпифиз были первыми органами, из которых выделены фракции низкомолекулярных регуляторных пептидов, обладающих высокой биологической активностью. Следует отметить, что короткие фрагменты, состоящие из 3—4 аминокислотных остатков, нередко оказываются более активными, чем исходные соединения. Не исключено, что цитомедины, образуемые в организме или введенные извне, подвергаются процессингу, в результате которого от суммарного комплекса полипептидов отщепляются фрагменты, состоящие из нескольких аминокислотных остатков и осуществляющие в данный момент необходимые регуляторные функции [4].

В связи с высокой биологической активностью пептидов эпифиза и зависимостью их синтеза от условий среды представлялось интересным изучение гормональных систем саморегуляции эпифиза при стрессе.

Материалы и методы

В опытах использовали 5 интактных крыс (контроль) и 5 крыс, подвергнутых 48-часовой водной и пищевой депривации (опыт). Животных декапитировали и извлекали эпифиз, который немедленно помещали в микропробирку, наполненную жидким азотом. Вся процедура занимала не более 1 мин. Замороженную эпифизарную ткань хранили при -70°C до использования.

Для получения олигопептидной фракции эпифизы помещали в микропробирку, содержащую 200 мкл 0,1 н. соляной кислоты, нагретой до 95°C на водяной бане, инкубировали при этой температуре 10 мин, охлаждали, гомогенизировали с помощью петлевого гомогенизатора, вращаемого со скоростью 10 000 об/мин, в течение 1 мин. Гомогенат обрабатывали ультразвуком 10 мин, инкубировали при 4°C 1 ч, центрифугировали при 8000 об/мин 30 мин, собирали супернатант. Супернатант нейтрализовали до pH 7,0 2М раствором гидроксида калия, замораживали при -20°C 10 мин для полного выпадения всех нерастворимых веществ в осадок и после оттаивания снова центрифугировали при 8000 об/мин 10 мин. Супернатант собирали и под-

вергали депротеинизации путем добавления ацетонитрила до концентрации 60 об.%, инкубировали при 85°C 1 мин, замораживали при -20°C 10 мин для полного выпадения всех нерастворимых веществ в осадок и после нагревания до комнатной температуры снова центрифугировали при 8000 об/мин 10 мин. Супернатант отделяли и выпаривали в токе теплого азота при 40°C до объема, приблизительно в 2 раза меньше первоначального объема экстракта. Затем объем экстракта доводили бидистиллированной водой до объема первоначального экстракта, центрифугировали при 3000 об/мин 5 мин.

Полученный депротеинизированный экстракт использовали для анализа методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Хроматографическая система включала в себя 2 насоса высокого давления БПЖ-71 и программирующее устройство САА-08 жидкостного хроматографа "Цвет 3110", динамический и статический смесители ("Amicon"), петлевой инжектор Rheodyne 7125, предколонку 2×7 мм с сорбентом сепарон С-18 5 мкм, хроматографическую колонку 3×150 мм с тем же сорбентом, фотометрический детектор Uvi-sord S11 (LKB) и компьютеризованную систему сбора и анализа хроматографических данных на базе IBM PC 486 с программным пакетом "Мульти-хром v1.39". Для анализа вводили пробу ультрафильтрата объемом 10—150 мкл и хроматографировали в градиентном режиме со скоростью подачи элюента 320 мкл/мин. Стартовый элюент А — раствор однозамещенного фосфата натрия концентрацией 50 мМ с добавлением 0,15 об. % ортофосфорной кислоты; финишный элюент Б — элюент А с добавлением 50 об. % ацетонитрила.

1 с, 10% элюента Б; 7200 с (2 ч), 80% элюента Б.

Оптическую плотность регистрировали при длине волны 206 нм. После анализа колонку кондиционировали при стартовых условиях в течение 20 мин. Для идентификации пиков хроматограммы использовали стандарты мелатонина, серотонина, окситоцина, вазопрессина, вазотоцина, эпиталона.

Результаты и их обсуждение

Данные о значительном усилении образования секреторного материала пинеалоцитами при осмотическом стрессе, полученные нами гистологическими методами [3], характеризуют только факт накопления секреторного материала и в меньшей степени — его состав. Результаты электрофизиологических экспериментов также свидетельствовали об активации секреторной активности пинеалоцитов при стрессе [7]. В связи с этим было предпринято исследование индольных и олигопептидных фракций эпифиза методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

При изучении экстрактов эпифиза контрольных крыс и животных, подвергнутых 48-часовой водной и пищевой депривации, выявлено изменение продукции пинеалоцитами серотонина и мелатонина под действием осмотического стресса. В эпифизе крыс при стрессе обнаружено приблизительно двукратное увеличение содержания серотонина (см. таблицу) при трехкратном снижении содержания мелатонина по сравнению с контролем, что

Содержание гормонов в эпифизе крыс (в моль/эпифиз)

Условия опыта	Вазотоцин	Окситоцин	Вазопрессин	Серотонин	Мелатонин
Контроль	$1,93 \cdot 10^{-11}$	$0,16 \cdot 10^{-11}$	$0,073 \cdot 10^{-11}$	$0,17 \cdot 10^{-11}$	$0,0048 \cdot 10^{-11}$
Стресс	$1,45 \cdot 10^{-11}$	$0,21 \cdot 10^{-11}$	$0,011 \cdot 10^{-11}$	$0,5 \cdot 10^{-11}$	$0,003 \cdot 10^{-11}$

указывает на снижение активности N-ацетилтрансферазы. Причиной таких изменений, скорее всего, является тормозящее действие кортикостерона, уровень которого в крови значительно возрастает во II фазу общего адаптационного синдрома, на связывание норадреналина с β -адренорецепторами и, таким образом, на путь превращения серотонина в мелатонин. Не исключено, что повышение содержания серотонина в эпифизе сопровождается также его секрецией в кровяное русло, однако это требует дополнительной экспериментальной проверки.

Незначительное содержание в эпифизе мелатонина на фоне активных секреторных процессов при осмотическом стрессе свидетельствует о том, что в дневное время эпифиз также вовлекается в стрессорный ответ, но секретирует в кровь не мелатонин, а другие гормоны пептидной природы и серотонин.

Нами обнаружено значительное увеличение фракции гидрофильных высокомолекулярных пептидов (несколько килодальтон) в экстракте эпифиза при осмотическом стрессе. Вероятно, именно эта фракция составляет основной объем гранул с пептидным содержимым, накопление которых при осмотическом стрессе зарегистрировано в пинеалоцитах методами электронной и световой микроскопии. Кроме того, в эпифизе при осмотическом стрессе зарегистрировано 3,5-кратное увеличение содержания вазопрессина по сравнению с контролем. Достоверных изменений содержания окситоцина или вазотоцина зарегистрировать не удалось.

Наиболее существенными источниками вазопрессина в эпифизе могут быть нервные терминалы из паравентрикулярного и супраоптического ядер гипоталамуса, а также поступление гормона из плазмы крови. Это выглядит правдоподобным, поскольку при осмотическом стрессе наблюдается усиление продукции вазопрессина гипоталамо-гипофизарной системой и увеличение его концентрации в плазме крови [10]. Повышение концентрации вазопрессина в эпифизе при осмотическом стрессе, вероятно, может иметь регуляторное значение и требует дальнейшего изучения. Незначительные изменения содержания в эпифизе при стрессе окситоцина и вазотоцина могут быть связаны с циркадной ритмикой этих гормонов. В частности, пик наибольшей секреции вазотоцина

эпифизом приходится на ночные, а не на дневные часы [13].

Выводы

1. Активная секреция эпифизом пептидных гормонов при таком хроническом виде стресса, как осмотический, скорее всего, носит адаптивный характер, поскольку пептиды эпифиза препятствуют таким цитотоксическим процессам, как образование свободных радикалов, апоптоз, стрессорная иммунодепрессия.

2. Торможение при осмотическом стрессе синтеза пинеалоцитами мелатонина, адаптогенные свойства которого также хорошо известны, по-видимому, определяется характерным для светлого времени суток дефицитом симпатической стимуляции железы, а также длительным избытком кортикостерона в крови.

ЛИТЕРАТУРА

1. Анисимов В. Н. // Рос. физиол. журн. — 1997. — Т. 83, № 8. — С. 1—13.
2. Арушанян Э. Б., Арушанян Л. Г., Элькебян К. С. // Успехи физиол. наук. — 1993. — Т. 24, № 4. — С. 12—23.
3. Коваленко Р. И., Сибаров Д. А., Павленко И. Н. и др. // Рос. физиол. журн. — 1997. — Т. 83, № 8. — С. 87—93.
4. Кузник Б. И., Морозов В. Г., Хавинсон В. Х. Цитомедины: 25-летний опыт экспериментальных и клинических исследований. — СПб., 1998.
5. Морозов В. Г., Хавинсон В. Х. // Докл. АН СССР. — 1981. — Т. 261, № 1. — С. 235—239.
6. Морозов В. Г., Хавинсон В. Х. // Успехи соврем. биол. — 1983. — Т. 96, вып. 3 (6). — С. 339—352.
7. Сибаров Д. А., Коваленко Р. И., Ноздрачев А. Д. // Рос. физиол. журн. — 2000. — Т. 86, № 8. — С. 1049—1052.
8. Слепушкин В. Д., Пашинский В. Г. Эпифиз и адаптация организма. — Томск, 1982.
9. Хавинсон В. Х., Морозов В. Г. Пептиды эпифиза и тимуса в регуляции старения. — СПб.
10. Aguilera G., Lightman S. L., Kiss A. // Endocrinology. — 1993. — Vol. 132, N 1. — P. 241—248.
11. Lukaszyk A., Reiter R. J. // Am. J. Anat. — 1975. — Vol. 143, N 4. — P. 451—464.
12. Nanu L., Ionescu V., Marcean-Petrescu R. // Endocrinologie. — 1978. — Vol. 16, N 1. — P. 11—14.
13. Pavel S. // J. Neural Transmiss. — 1978. — Vol. 13, N 1. — P. 135—155.
14. Petrelli C., Moretti P., Petrelli F., Barra D. // Ital. J. Biochem. — 1992. — Vol. 41, N 3. — P. 170—182.

Поступила 11.06.03