

І.І. Заморський, В.П. Пішак, С.С. Ткачук

РОЛЬ НЕАДРЕНЕРГІЧНОЇ РЕГУЛЯЦІЇ В РЕАКЦІЇ ШИШКОПОДІБНОГО ТІЛА НА ГОСТРУ ГІПОКСІЮ

Кафедра патологічної фізіології і медичної фізики (зав. — проф. В. Ф. Мислицький)

Кафедра медичної біології і генетики (зав. — проф. В. П. Пішак)

Кафедра нормальної фізіології (зав. — д. м. н. О. Л. Кухарчук)

Буковинської державної медичної академії

Ключові слова: шишкоподібне тіло, цАМФ, цГМФ, гостра гіпобарична гіпоксія, α -метил-*n*-тирозин, α - і β -адреноблокатори.

Резюме. В роботі досліджено вплив гострої гіпобаричної гіпоксії на вміст цАМФ і цГМФ в шишкоподібному тілі самців ювенільних щурів на фоні введення антиадренергічних речовин: блокатору синтезу катехоламінів — α -метил-*n*-тироzinу — та α - і β -адреноблокаторів. Встановлено, що вміст циклічних нуклеотидів в шишкоподібному тілі після гострої гіпоксії збільшується, а після введення антиадренергічних речовин — зменшується. Гостра гіпоксія на фоні попереднього введення антиадренергічних речовин збільшує пінеальний вміст циклічних нуклеотидів, що вказує на участь неадренергічних впливів в регуляції активності шишкоподібного тіла щурів за гострої гіпоксії.

Вступ. Шишкоподібне тіло включають до складу стрес-лімітуючих систем, які обмежують прояви стресових реакцій і здійснюють антистресовий захист мозку [4]. Так, деякими авторами [4, 9, 14] показано, що при різних видах стресу виникає функціональна активація пінеалоцитів із збільшенням активності ключового ферменту синтезу індольних гормонів — *N*-ацетилсеротоніну, що супроводжується посиленням вироблення в шишкоподібному тілі мелатоніну. При стресі безпосередній вплив на функціональну активність пінеалоцитів можуть здійснювати як нервові, так і різноманітні гуморальні фактори, зокрема глюкокортикоїди [4, 5]. Основний контроль за утворенням індолів в шишкоподібному тілі реалізують адренергічні симпатичні нерви периферичного походження. Норадреналін, який вивільняється з останніх, діє через α - і β -адренорецептори пінеалоцитів [6] та активує зв'язані з цими рецепторами аденілатциклазу [1, 17] і гуанілатциклазу [11, 13], що призводить до збільшення внутрішньоклітинного вмісту циклічних нуклеотидів. Останнє можна вважати пусковим фактором для синтезу індолів в шишкоподібному тілі. Хоча шишкоподібне тіло отримує не тільки адренергічні нервові закінчення, а й інші, зокрема, холінергічні, серотонінергічні, гістамінергічні, різноманітні пептидергічні як периферичного, так і центрального походження [2, 12]; роль їх в регуляції функціональної активності пінеалоцитів залишається недостатньо вивченою. Тому дослідження участі неадренергічної регуляції в реакції шишкоподібного тіла на гострі стресові впливи, зокрема при гіпоксії, може пролити світло як на участь центральної і периферичної неадренергічної іннервації в регуляції шишко-

подібного тіла, так і на деякі механізми антистресового захисту нервової системи за допомогою шишкоподібного тіла.

Мета дослідження. Дослідити вплив гострої гіпобаричної гіпоксії на вміст цАМФ і цГМФ в шишкоподібному тілі щурів на фоні спільного введення α - і β -адреноблокаторів (α -, β -АБ) та інгібітору синтезу катехоламінів — α -метил-*n*-тирозину (α -МТ), інгібітору тирозингідроксилази.

Матеріал і методи. Досліди проведено на 47 статевонезрілих самцях безпородних білих щурів масою 65-75 г, які досягали на момент визначення циклічних нуклеотидів в шишкоподібному тілі ювенільного віку (5,5-6,0 тижнів). Щурів утримували при температурі 20-24°C на стандартному вітамінізованому харчовому раціоні з вільним доступом до води. За два тижні до початку досліджень визначали їх чутливість до гіпоксії і в подальшому використовували лише середньостійких до гіпоксії тварин. Відібраних тварин рандомізовано розділили на п'ять груп. Одній групі тварин ($n = 22$) за чотири доби до моделювання гострої гіпоксії внутрішньоочередово щоденно вводили ефірну сполуку α -МТ ("Koch-Light", Великобританія) в дозі 150 мг на кг ваги тіла, розчинену в 0,9% розчині хлориду натрію, причому в перший день здійснювали дві ін'єкції, після цього — по одній в день. Останню, шосту, ін'єкцію робили за 1 годину до моделювання гострої гіпоксії. Після цього цим тваринам за 30 хвилин до моделювання гострої гіпоксії вводили α -адреноблокатор — дроперидол ("Gedcon Richter", Угорщина) в дозі 0,4 мг на кг ваги тіла і β -адреноблокатор — обзидан (пропранолола гідрохлорид, "Arzneimittelwerk Dresden GmbH", Німеччина) в дозі 1 мг на кг ваги тіла. Дози препаратів були обрані з урахуванням даних літератури про фармакологічну активність препаратів та чутливість тварин до них [10]. Другій групі ($n = 8$) вводили еквівалентну кількість розчинника, а третя ($n = 8$) залишалась інтактною. Оскільки досліджувані показники у двох останніх групах (з введенням і без введення розчинника) статистично не відрізнялись, ці групи при обробці результатів дослідження були об'єднані у спільну контрольну групу.

З тварин першої групи, яким вводили адренотропні речовини, одна частина залишалась інтактною, а іншу — піддавали дії гострої гіпоксичної гіпобаричної гіпоксії, яку моделювали в модифікованій барокамері шляхом "підйому" тварин на висоту 12000 метрів зі швидкістю 58 мм рт. ст. за 1 хв при 22°C. На "висотному плато" щурів витримували до моменту другого агонального вдиху, після чого здійснювали "спуск" на попередню нульову висоту, відновлюючи нормальний атмосферний тиск і життєдіяльність тварин.

Евтаназію тварин виконували в світловий період доби в звичайних умовах освітлення шляхом декапітації через 30 хв після припинення дії гострої гіпоксії. Видалені шишкоподібні тіла, по два на одне визначення (наважка дорівнювала 1,5–2 мг), гомогенізували у фосфатному буфері (рН = 7,4). Екстракцію циклічних нуклеотидів з гомогенатів шишкоподібних тіл проводили на мініколонках "Amprep" ("Amersham", Великобританія) з елюцією 6% трихлороцтовою кислотою. Визначення цАМФ і цГМФ в отриманому елюенті виконували радіоімунологічно за допомогою наборів "cAMP" і "cGMP" ("Immunotech", Франція), розраховуючи кількість циклічних нуклеотидів в нмоль на г тканини. Статистичну обробку отриманих даних здійснювали за допомогою програми "STATISTICA 5.0"

[7] з використанням для оцінки вірогідності різниць окремих груп даних параметричного (t Стьюдента) та непараметричних (Вілкоксона, U Манна-Уїтні) критеріїв, а також одностороннього дисперсійного аналізу "ANOVA".

Результати досліджень та їх обговорення. Після гострої гіпоксії (табл.) в шишкоподібному тілі щурів збільшується вміст як цАМФ (в середньому на 29%), так і цГМФ (в середньому на 37%) в порівнянні з показниками у контрольних тварин; при цьому співвідношення між вмістом різних циклічних нуклеотидів залишається таким самим, як і у контрольних тварин. Отримані нами дані підтверджуються даними інших авторів [8] про наявність морфологічних ознак підсилення функціональної активності пінеалоцитів за гострої гіпоксії. Отже, за дії гострої гіпоксії, як і за дії інших стресорів [4], пінеалоцити активуються, що в наступному може збільшувати утворення пінеальних індольних гормонів, зокрема мелатоніну. Функціональну активацію шишкоподібного тіла за гострої гіпоксії можна віднести до захисних антистресових механізмів, оскільки мелатонін, як виражений антиоксидант [16], володіє нейропротекторними властивостями та захищає нервову систему від окисного стресу [4].

Таблиця

Вплив α -метил-*n*-тирозину (МПТ) та α - і β -адреноблокаторів (α -, β -АБ) за гострої гіпобаричної гіпоксії на вміст циклічних нуклеотидів в шишкоподібному тілі щурів ($M \pm m$, $n=5$)

Умови досліджу	Вміст цАМФ, нмоль на г тканини	Вміст цГМФ, нмоль на г тканини	Співвідношення цАМФ / цГМФ
Контроль	5,9±0,41	0,30±0,027	19,8±1,96
Гіпоксія	7,6±0,36*	0,41±0,039*	18,5±1,92
МПТ+ α -, β -АБ	4,1±0,42*	0,18±0,018*	24,0±2,05
МПТ+ α -, β -АБ і гіпоксія	11,5±0,98***	0,52±0,050***	22,8±2,11

Примітка. * $p < 0,05$ в порівнянні з показниками у контрольних тварин;
 ** $p < 0,05$ в порівнянні з показниками у тварин після гіпоксії без введення адренотропних речовин;
 *** $p < 0,05$ в порівнянні з показниками у тварин з введенням адренотропних речовин.

Після одночасного введення α -МТ та α -, β -АБ, яке не супроводжувалось дією гострої гіпоксії, виявлено статистично вірогідне зменшення в середньому на 35% в порівнянні з показниками у контрольних тварин вмісту в шишкоподібному тілі обох циклічних нуклеотидів із збереженням співвідношення вмісту між ними. α -МТ, як блокатор тирозингідроксилази, порушує синтез з тирозину дофаміну і, в подальшому, норадреналіну. З адренергічних симпатичних волокон буде відповідно в меншій кількості виділятися норадреналін, кількість активованих α - і β -адренорецепторів на поверхні пінеалоцитів буде зменшуватись, активність аденілат- і гуанілатциклази, співз'язаних з адренорецепторами [1, 17], – знижуватись. Тому введення α -МТ експериментальним тваринам та людині призводить до зменшення утворення мелатоніну [18, 19]. Застосована нами додаткова блокада

адренорецепторів повинна збільшувати негативний вплив α -МТ на погіршення утворення в пінеалоцитах циклічних нуклеотидів, що і встановлено в наших дослідженнях.

Визначення вмісту циклічних нуклеотидів в шишкоподібному тілі щурів при гострій гіпоксії на фоні попереднього введення α -МТ з α -, β -АБ призвело до дещо несподіваних результатів. Виходячи з загальноприйнятого положення про головну регуляцію активності пінеалоцитів з боку симпатичних адренергічних волокон [3], можна було б припустити, що при порушенні адренергічної регуляції буде реєструватись зменшення вмісту циклічних нуклеотидів в шишкоподібному тілі, незважаючи на гостру гіпоксію. Однак наші дослідження показали прямо протилежні зміни: вміст цАМФ за цих умов збільшувався в порівнянні з показниками у контрольних тварин в середньому на 95%, а вміст цГМФ — на 73%. При цьому співвідношення вмісту цАМФ до цГМФ вірогідно не змінювалось. Такі результати вказують на участь в механізмах функціональної активації шишкоподібного тіла при гострій гіпоксії неадренергічних впливів. З одного боку, такі впливи можуть мати гуморальний характер, зокрема з боку глюкокортикоїдів [4]. З іншого боку, шишкоподібне тіло отримує різноманітні неадренергічні нервові волокна як периферичного походження — від симпатичних гангліїв (верхнього шийного, крилопіднебінного, трійчастого та інших), так і центрального походження, в тому числі від тих структур, що задіяні у реакції нервової системи на стресові впливи: вазопресинергічні і окситоцинергічні волокна від паравентрикулярного і супрахіазматичного ядер гіпоталамуса, різноманітні пептидергічні волокна від структур епіталамуса та таламуса, серотонінергічні волокна від ядер шва [2, 15]. При цьому доведена участь деяких з цих неадренергічних волокон в регуляції утворення циклічних нуклеотидів в шишкоподібному тілі. Так, вазоінтестинальний пептид, що вивільняється з ВІП-ергічних волокон та діє на клітини шишкоподібного тіла через власні ВІП-ергічні рецептори, які незалежні від адренергічних рецепторів, здатний стимулювати внутрішньопінеальну аденілатциклазу [17]. Таким чином, неадренергічна регуляція шишкоподібного тіла допомагає включенню останнього в антистресовий захист нервової системи і організму в цілому за гострої гіпоксії.

Висновки.

1. За гострої гіпоксії в шишкоподібному тілі самців статевонезрілих щурів збільшується вміст циклічних нуклеотидів.
2. Посилення функціональної активності шишкоподібного тіла при гострій гіпоксії виникає за участю неадренергічної регуляції.

Література. 1. Пішак В.П. Шишкоподібне тіло: біохімія. — Чернівці, 1996. — 173 с. 2. Пішак В.П. Шишкоподібне тіло. Морфологія. — Чернівці, 1996. — 158 с. 3. Анисимов В.Н., Reiter R.J. Функция эпифиза при раке и старении // Вопр. онкологии. — 1990. — Т. 36, № 3. — С. 259–268. 4. Арушанян Э. Б. Участие эпифиза в антистрессовой защите мозга // Успехи физиол. наук. — 1996. — Т. 27, № 3. — С. 31–50. 5. Арушанян Э. Б., Арушанян Л. Г., Эльбекян К. С. Место эпифизарно-адренкортикальных отношений в поправочной регуляции поведения // Успехи физиол. наук. — 1993. — Т. 24, № 4. — С. 12–28. 6. Бондаренко Л. А. Современные представления о физиологии эпифиза // Нейрофизиология. — 1997. — Т. 29, № 3. — С. 212–237. 7. Боровиков В. П. Популярное введение в программу STATISTICA. — М.: Компьютер–Пресс. 1998. — 267 с. 8. Васильев Г. А., Медведев Ю. А., Хмельницкий О. К. Эндокринная система при кислородном голодании. — Л.: Наука, 1974. — 172 с. 9. Коваленко Р. И., Сибаров Д. Л., Павленко И. Н. и др. Структура пинеалоцитов крысы при стрессе и после унилатеральных интраназальных введений окситоцина // Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. — 1997. — Т. 83, № 8. — С. 87–93. 10. Резников А. Г. Половые гормоны и дифференциация мозга. — К.: Наук. думка, 1982. — 252с. 11. Chik C. L., Liu Q. Y., Li B. et al. cGMP inhibits I-type Ca^{2+} channel currents

252c. 11. *Chik C. L., Liu Q. Y., Li B. et al.* cGMP inhibits l-type Ca^{2+} channel currents through protein-phosphorylation in rat pinealocytes // *J. Neurosci.* – 1995. – V. 15, N 4. – P. 3104–3109. 12. *Ebadi M., Govitrapong P.* Neural pathways and neurotransmitters affecting melatonin synthesis // *J. Neural. Transmiss.* – 1986. – Suppl. 21. – P. 125–155. 13. *Ho A. K., Chik C. L.* Phosphatase inhibitors potentiate adrenergic-stimulated cAMP and cGMP production in rat pinealocytes // *Am. J. Physiol.-Endocrinol.* – 1995. – V. 31, N 3. – P. E458–E466. 14. *Lynch H. J., Deng M.-H.* Pineal responses to stress // *J. Neural Transmiss.* – 1986. – Suppl. 21. – P. 461–473. 15. *Moller M.* Fine structure of the pinealopetal innervation of the mammalian pineal gland // *Microsc. Res. and Techn.* – 1992. – V. 21, N 3. – P. 188–204. 16. *Reiter R. J.* Functional pleiotropy of the neurohormone melatonin: antioxidant protection and neuroendocrine regulation // *Front. Neuroendocrinol.* – 1995. – V. 16, N 4. – P. 383–415. 17. *Sugden D.* Melatonin biosynthesis in the mammalian pineal gland // *Experientia.* – 1989. – V. 45, N 10. – P. 922–932. 18. *Zimmermann R. C., Krahn L., Klee G. et al.* Inhibition of presynaptic catecholamine synthesis with alpha-methyl-para-tyrosine attenuates nocturnal melatonin secretion in humans // *J. Clin. Endocrinol.* – 1994. – V. 79, N 4. – P. 1110–1114. 19. *Zimmermann R. C., Krahn L., Klee G. et al.* The impact of gender on alpha-methyl-paratyrosine mediated changes in prolactin secretion and 6-hydroxymelatonin sulfate excretion // *Psychoneuroendocrinology.* – 1996. – V. 21, N 5. – P. 469–478.

THE ROLE OF NONADRENERGIC REGULATION IN PINEAL RESPONSE TO ACUTE HYPOXIA

I. I. Zamorskyi, V. P. Pishak, S. S. Tkachuk

Abstract. The influence of acute hypobaric hypoxia on the cAMP and cGMP contents in the pineal body of juvenile male rats against a background of antiadrenergic drugs administration (α -methyl-*p*-tyrosine as an inhibitor of the catecholamines synthesis and α - and β -adrenoblocker) was investigated. It was established that acute hypoxia increased the pineal cyclic nucleotide contents, and the antiadrenergic drugs decreased their contents. Acute hypoxia together with antiadrenergic drugs pretreatment increased the pineal cyclic nucleotide contents. The obtained results are indicative of the participation of nonadrenergic influences in the regulation of the activity of the rats' pineal body under conditions of acute hypoxia.

Key words: pineal body, cAMP, cGMP, acute hypobaric hypoxia, α -methyl-*p*-tyrosine, α - and β -adrenoblocker.

Bukovinian State Medical Academy (Chernivtsi).
