

А. С. БЕЗЛЮДНА<sup>1</sup>, А. С. ПУСТОВАЛОВ<sup>1</sup>, М. Г. МАТВІЄНКО<sup>2</sup>,  
М. Е. ДЗЕРЖИНСЬКИЙ<sup>1</sup>

## ВПЛИВИ $\alpha$ -АДРЕНЕРГІЧНОЇ, КІСПЕПТИНЕРГІЧНОЇ ТА МЕЛАТОНІНОВОЇ СИСТЕМ НА МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН КЛІТИН КОРИ НАДНИРНИКІВ СТАТЕВОЗРІЛИХ ЩУРІВ

Надійшла 05.03.15

В експериментах на молодих білих щурах статевозрілого віку (три місяці) досліджували вплив  $\alpha$ -адренергічної, кіспептинергічної та мелатонінової систем на морфофункціональний стан клітин кори наднирників. Дія зазначених факторів регуляції у трьох зонах кори наднирників проявлялася по-різному. Для клубочкової зони вирішальне значення мали стан  $\alpha$ -адренергічної системи та високі рівні мелатоніну, а роль кіспептинергічної системи була другорядною. Кіспептинергічна регуляція відігравала основну роль у модуляції стану клітин пучкової зони. Водночас спонгіоцити в цій зоні інактивувалися при блокуванні як кіспептинергічної, так і  $\alpha$ -адренергічної системи. Для підтримання адекватного стану спонгіоцитів сітчастої зони кори наднирників були необхідними достатні рівні активності  $\alpha$ -адренергічної та кіспептинергічної систем одночасно, а впливи мелатоніну не мали вирішального значення.

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** наднирники, спонгіоцити, кіспептин, мелатонін,  $\alpha$ -адренорецептори, мезатон, празозин.

### ВСТУП

Гіпоталамо-гіпофізарно-адреналова система (ГГАС) відіграє виключно важливу роль у підтриманні гомеостазу та стійкості організму до стресорних впливів. Гіпоталамус є найвищою центральною ланкою зазначеної системи, а наднирники являють собою периферичний виконавчий відділ. Зв'язок між різними ланками ГГАС реалізується на основі гормональних впливів [1, 2].

Діяльність наднирників тісно пов'язана із впливами, що надходять від моноамінергічних систем головного мозку, зокрема адренергічної [3]. Адренергічні впливи опосередковуються дією катехоламінів (КА), до яких належать норадреналін, дофамін, а також адреналін (головний гормон, що секретується мозковою речовиною наднирників) [4]. Наднирники секретують адреналін і норадреналін у відповідь на ацетилхолінергічну активацію

нікотинових холінергічних рецепторів, розташованих на мембранах хромафінних клітин [5]. Цей процес регулюється на основі активації адренорецепторів (АР);  $\alpha 2$ -АР інгібують вивільнення КА за рахунок спряження з інгібуючими Gі-білками, а  $\beta$ -АР (в основному їх  $\beta 2$ -підтип) посилюють вивільнення КА через спряження зі стимулюючими Gs-білками. Всі АР є G-білок-спряженими рецепторами (GPCR), а GPCR-кінази (GRK) регулюють їх сигнали і функції [6]. У наднирниках GRK2-опосередкована десенсибілізація  $\alpha 2$ -АР збільшується в умовах серцевої недостатності, і це розглядається як фундаментальний регулятор секреції КА наднирниками. Розкриття процесів відновлення в наднирниках  $\alpha 2$ -АР-сигналів через інгібування GRK2, а також ролі наднирникових АР у регуляції симпатичної гіперактивності відкриває нові цікаві перспективи щодо розуміння механізмів розвитку серцевої недостатності та виявлення нових терапевтичних мішеней при її лікуванні [7, 8].

Нещодавно було відкрито ще одну систему, задіяну в регуляцію ГГАС, – кіспептинергічну, що стало істотним внеском у нейроендокринологію. Кіспептинергічна система включає в себе гіпота-

<sup>1</sup> Навчально-науковий центр «Інститут біології» при Київському національному університеті ім. Тараса Шевченка (Україна).

<sup>2</sup> Інститут проблем патології при Національному медичному університеті ім. О. О. Богомольця МОЗ України, Київ (Україна).  
Ел. пошта: grandmaster.majority@yandex.ru (М. Г. Матвієнко).

ламічні кіссептинергічні нейрони та рецептори кіссептину (KISS1R, або GPR54). Кіссептинергічні нейрони ідентифікували в різних зонах гіпоталамуса, в тому числі в паравентрикулярному ядрі (ПВЯ), яке є головним місцем синтезу кортикотропін-релізінг-гормону в ссавців [9]. Кіссептин був виявлений також у гіпофізарній портальній крові щурів, а KISS1R ідентифікували в адренкортикоцитопитах аденогіпофіза. Введення екзогенного кіссептину стимулює синтез кортикостерону, викликає гіпертермію та інтенсифікує рухову поведінку щурів [10–12]. Це є підтвердженням того, що кіссептин безпосередньо залучений у регуляцію ГГАС. Крім того, було показано, що кіссептин і його рецептори експресуються в корі наднирників людини та інших ссавців; отже, зазначений пептид може виступати як аутокринний або паракринний регулятор синтезу гормонів даної залози [13, 14].

У ссавців інформація щодо фотоперіоду передається від сітківки ока до супрахіазматичного ядра гіпоталамуса; останнє, в свою чергу, через мультисинаптичні шляхи регулює секрецію гормону мелатоніну церебральним епіфізом (шишкоподібною залозою). Ефекти даного гормону залежать від різних факторів – віку тварин (мелатонін на певних етапах розвитку пригнічує секрецію гонадотропінів, а отже, і естрадіолу, який активує синтез кортикотропіну та кортикостероїдів) [15], сезону року, часу введення в межах доби (оскільки мелатонін синтезується в основному вночі, то його концентрація буде сумуватись із такою екзогенного мелатоніну), концентрації ін'єктованого мелатоніну [16]. Під дією світла рівень мелатоніну в плазмі крові зменшується, а рівень кортизолу – зростає; при цьому дія обох гормонів є взаємопов'язаною, що відіграє важливу роль у регуляції циркадіанних ритмів [17, 18].

Таким чином, мелатонін, кіссептин та  $\alpha$ -адренергічні агенти складним чином та в різній мірі є залученими до контролю ГГАС ссавців. У літературі з'явилися повідомлення про те, що мелатонін відіграє важливу роль у регуляції кіссептинергічної системи [19, 20]. Проте багато аспектів даного механізму поки залишаються недослідженими. Зокрема, заслуговують на детальніше вивчення особливості взаємодії кіссептинергічної системи з  $\alpha$ -адренергічною та мелатоніновою системами та роль такої взаємодії в модуляції функцій ГГАС. Враховуючи це, ми вивчали морфологічний стан клітин кори наднирників, тобто клітин периферичної виконавчої ланки ГГАС, в умовах модуляції впливів, що надходять від зазначених систем.

## МЕТОДИКА

Експерименти було проведено на тримісячних самцях щурів лінії Вістар, тобто на молодих статевозрілих тваринах. Терміни даного дослідження узгоджувались зі загальноприйнятою класифікацією вікових періодів тварин даного виду та лінії [21]. Щурів утримували в стандартних умовах віварію.

Враховуючи завдання дослідження, всіх тварин було розділено на 10 груп по п'ять особин у кожній. Брало до уваги те, що агенти, використані в експерименті, мають різні рекомендовані способи введення. Кіссептин і антагоніст кіссептину вводили інтрацеребровентрикулярно (і.ц.в.), празозин і мелатонін – перорально (п.о.), а мезатон – підшкірно (п.ш.). Очевидно, що такі різні способи введення викликали у тварин стрес різної інтенсивності, і це необхідно було враховувати при дослідженні. Загальновідомо, що стрес істотно впливає на стан нейросекреторних нейронів гіпоталамуса, пов'язаних із наднирниками, а в даній роботі досліджували саме морфологічний стан останніх. Тому для підвищення об'єктивності оцінки впливу препаратів на клітини наднирників тварини в наших дослідах зазнавали маніпуляцій, що відповідали усім трьом способам введення. При цьому експериментальну речовину вводили рекомендованим способом, але це супроводжувалось введеннями фізіологічного розчину у відповідних об'ємах двома іншими згаданими способами.

Тваринам контрольної групи вводили лише фізіологічний розчин (0.9 %-вий ізотонічний розчин натрію хлориду; «Індар», Україна) одночасно трьома способами – п.о. по 0.5 мл, і.ц.в. по 12.5 мкл і п.ш. по 0.5 мл. Щури двох інших груп зазнавали і.ц.в.-введення 12.5 мкл агоніста кіссептинергічних рецепторів GPR54 кіссептину (метастин-(45-54)-амід; «Sigma», США) або антагоніста кіссептину P-234 (кіссептин-234-трифторацетат; «Sigma», США) у такій самій дозі; їм також вводили фізіологічний розчин двома способами (п.о. і п.ш. по 0.5 мл).

Інтенсифікацію функції мелатонінової системи моделювали тим, що щурам наступної групи вводили екзогенний мелатонін (Віта-мелатонін; Київський вітамінний завод, Україна) п.о. в дозі 1.0 мг/кг маси тіла, а також вводили фізіологічний розчин і.ц.в. по 12.5 мкл і п.ш. по 0.5 мл. Тваринам двох інших груп давали 10 мг/кг маси тіла мелатоніну (п.о.), по 0.5 мл фізіологічного розчину п.ш. та 12.5 мкл розчину кіссептину чи P-234 відповідно і.ц.в.

Тваринам іншої експериментальної групи ін'єкували синтетичні адреноміметики мезатон (мезатон, або фенілефрин; ТОВ «Дослідний завод ГНЦЛС», Україна) п.ш. у дозі 1.0 мг/кг маси тіла та одночасно вводили фізіологічний розчин 0.5 мл п.о. і 12.5 мкл цього розчину і.ц.в. Мезатон селективно активує  $\alpha$ -адренорецептори, практично не впливаючи на  $\beta$ -рецептори [16]. Була також сформована група тварин, на яких досліджували комбінований вплив мезатону (п.ш. у згаданій вище дозі) та і.ц.в. ін'єкцій Р-234 (12.5 мкл); дані тварини одночасно отримували (п.о.) 0.5 мл фізіологічного розчину.

Тварини ще однієї групи отримували празозин п.о. (празозин-Ратіофарм; «Меркль», ФРН) у дозі 1.0 мг/кг маси тіла і при цьому додатково фізіологічний розчин (0.5 мл п.ш. і 12.5 мкл і.ц.в.). Празозин належить до  $\alpha$ -адреноблокаторів з гіпотензивною дією; його особливістю є вибірковий вплив на  $\alpha$ -адренорецептори [22]. Також створили групу щурів для дослідження комбінованого впливу празозину (п.о. в дозі 1.0 мг/кг маси тіла) та кіссептину (і.ц.в. по 12.5 мкл); ці тварини також отримували 0.5 мл фізіологічного розчину.

Після закінчення курсу введення зазначених агентів щурів усіх груп наркотизували (внутрішньом'язово вводили анестетичну суміш кетамін/ксилазин 9:1, 100 мг/кг маси тіла [23]) і розтинали, забираючи наднирники. Відпрепаровані органи фіксували в рідині Буена і далі обробляли згідно зі стандартними гістологічними методиками. З парафінових блоків на ротатійному мікротомі виготовляли зрізи завтовшки 7 мкм, які забарвлювали гематоксиліном Бюмера та еозином. Отримані гістологічні препарати аналізували, проглядаючи під світловим мікроскопом. Мікрофотографії робили за допомогою мікроскопа з відеокамерою Olympus BX51 system, обладнаної цифровою фотокамерою, з програмним забезпеченням «Olympus DP 80 FT 3.2» на базі комп'ютера з операційною системою Windows XP. Необхідні морфометричні параметри вимірювали на фотознімках з використанням програмного забезпечення для аналізу й обробки зображень «Image J 1.42q» (National Institutes of Health, США). Вимірювали площі поперечного перерізу ядер (Пя) спонгіоцитів та площі транс'ядерного поперечного перерізу цих клітин (площі перерізу перикарионів – Ппк) у трьох зонах кори наднирників – клубочковій, пучковій та сітчастій. Дані параметри корелюють з рівнем синтетичної та секреторної активності клітин вказаних структур [24].

Для кількісної обробки отриманих результатів

застосовували стандартні методи варіаційної статистики, користуючись програмним забезпеченням «Origin Pro 8.5.1. SR2» для Windows (МА 01060, США). Вірогідність міжгрупових відмінностей оцінювали за допомогою U-критерію Манна–Уїтні. Число вимірюваних об'єктів  $n$  в усіх вибірках складало порядку 130. Порівнювали дані щодо піддослідних груп тварин з контролем. Крім того, групи тварин, яким вводили кіссептин чи антагоніст кіссептину, порівнювали з відповідними групами без уведення вказаних агентів.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Перевірка форми розподілів вимірюваних параметрів (Ппк та Пя) показала, що у більшості випадків ці розподіли можна було вважати нормальними.

У клубочковій зоні кори наднирників тварин контрольної групи середнє значення Пя спонгіоцитів становило  $18.73 \pm 0.18$ , а Ппк цих клітин –  $70.65 \pm 0.78$  мкм<sup>2</sup>. У пучковій зоні відповідні показники склали  $24.48 \pm 0.22$  та  $96.75 \pm 1.20$  мкм<sup>2</sup>, а в сітчастій зоні –  $19.86 \pm 0.16$  та  $76.57 \pm 0.62$  мкм<sup>2</sup> (див. таблицю). У пучковій зоні кори наднирників вимірювані показники спонгіоцитів виявилися найвищими у тварин контрольної групи.

Після введення антагоніста кіссептину середнє Пя спонгіоцитів у клубочковій зоні дорівнювало  $16.7 \pm 0.11$ , а Ппк клітин –  $60.96 \pm 0.38$  мкм<sup>2</sup>. У пучковій зоні відповідні значення становили  $18.92 \pm 0.20$  та  $68.52 \pm 0.60$  мкм<sup>2</sup>, а у сітчастій –  $17.26 \pm 0.13$  та  $63.43 \pm 0.37$  мкм<sup>2</sup> (див. таблицю). Отже, спостерігалось очевидне зменшення морфометричних параметрів спонгіоцитів у всіх трьох зонах наднирника під дією антагоніста кіссептину порівняно з контролем. Варто зауважити, що в даній групі показники досягали своїх найменших значень. Все це вказує на досить потужний гальмівний ефект Р-234 щодо функціонального стану спонгіоцитів кори наднирника.

У групі з уведенням кіссептину середні значення досліджуваних параметрів у спонгіоцитів кори клубочкової зони становили  $23.78 \pm 0.24$  та  $86.39 \pm 0.63$  мкм<sup>2</sup> відповідно. Ці ж самі показники в пучковій зоні дорівнювали  $27.87 \pm 0.15$  та  $113.55 \pm 0.55$  мкм<sup>2</sup> відповідно, а у сітчастій –  $22.93 \pm 0.27$  та  $83.91 \pm 0.50$  мкм<sup>2</sup> (див. таблицю). Отже, ін'єкції кіссептину спричиняли вірогідне збільшення середніх значень Пя та Ппк спонгіоцитів у трьох зо-

**Середні значення ( $M \pm m$ , мкм<sup>2</sup>) площ поперечного перерізу спонгіоцитів та їх ядер у різних зонах наднирників щурів в умовах модуляції інтенсивності впливів адренергічної, кіссептинергічної та мелатонінової систем**

| Групи тварин                                     | Площа перерізів (мкм <sup>2</sup> ) |                             |                            |                             |                            |                            |
|--|-------------------------------------|-----------------------------|----------------------------|-----------------------------|----------------------------|----------------------------|
|  | у клубочкової зоні                  |                             | у пучкової зоні            |                             | у сітчастій зоні           |                            |
|  | ядер                                | клітин                      | ядер                       | клітин                      | ядер                       | клітин                     |
| Контроль   | 18.73 ± 0.18                        | 70.65 ± 0.78                | 24.48 ± 0.22               | 96.75 ± 1.20                | 19.86 ± 0.16               | 76.57 ± 0.62               |
| З уведенням антагоніста кіссептину               | 16.7 ± 0.11*                        | 60.96 ± 0.38*               | 18.92 ± 0.20*              | 68.52 ± 0.60*               | 17.26 ± 0.13*              | 63.43 ± 0.37*              |
| З уведенням кіссептину                           | 23.78 ± 0.24*                       | 86.39 ± 0.63*               | 27.87 ± 0.15*              | 113.55 ± 0.55*              | 22.93 ± 0.27*              | 83.91 ± 0.50*              |
| З уведенням мелатоніну                           | 22.37 ± 0.17*                       | 84.85 ± 0.45*               | 27.31 ± 0.22*              | 108.99 ± 0.61*              | 19.42 ± 0.21               | 75.38 ± 0.50               |
| З уведенням мелатоніну та антагоніста кіссептину | 21.06 ± 0.16* <sup>^</sup>          | 80.42 ± 0.79* <sup>^x</sup> | 25.03 ± 0.20 <sup>^</sup>  | 97.4 ± 0.76 <sup>x</sup>    | 19.61 ± 0.25               | 76.03 ± 0.48               |
| З уведенням мелатоніну та кіссептину             | 29.25 ± 0.23* <sup>+</sup>          | 91.16 ± 0.91* <sup>+</sup>  | 34.17 ± 0.39* <sup>+</sup> | 163.68 ± 2.03* <sup>+</sup> | 25.69 ± 0.24* <sup>+</sup> | 95.85 ± 1.18* <sup>+</sup> |
| З уведенням мезатону (α-адреноміметика)          | 18.59 ± 0.16                        | 70.53 ± 0.41                | 25.57 ± 0.19*              | 102.23 ± 0.48*              | 21.62 ± 0.17*              | 80.32 ± 0.51*              |
| З уведенням мезатону та антагоніста кіссептину   | 18.51 ± 0.16                        | 69.15 ± 0.57 <sup>x</sup>   | 19.19 ± 0.22* <sup>x</sup> | 78.08 ± 0.51* <sup>x</sup>  | 18.45 ± 0.22* <sup>x</sup> | 70.19 ± 0.73* <sup>x</sup> |
| З уведенням празозину                            | 17.77 ± 0.16*                       | 62.16 ± 0.31*               | 19.96 ± 0.21*              | 75.76 ± 0.47*               | 18.84 ± 0.17*              | 64.19 ± 0.43*              |
| З уведенням празозину та кіссептину              | 19.12 ± 0.20 <sup>+</sup>           | 70.98 ± 0.50 <sup>+</sup>   | 21.02 ± 0.22* <sup>+</sup> | 89.34 ± 0.79* <sup>+</sup>  | 20.08 ± 0.17 <sup>+</sup>  | 77.57 ± 0.51 <sup>+</sup>  |

Примітки. Відмінність вірогідна ( $P < 0.05$ ): \* щодо значень у контрольній групі, \*\* щодо значень у відповідній групі без кіссептину; \*<sup>x</sup> щодо значень у відповідній групі без антагоніста кіссептину.

нах кори наднирника, що вказує на інтенсифікацію синтетичних процесів у даних клітинах.

В умовах дії екзогенного мелатоніну Пя спонгіоцитів клубочкової зони дорівнювала в середньому  $22.37 \pm 0.17$ , а Ппк цих клітин –  $84.85 \pm 0.45$  мкм<sup>2</sup>. Відповідні показники в пучковій зоні склали  $27.31 \pm 0.22$  та  $108.99 \pm 0.61$  мкм<sup>2</sup>, а у сітчастій –  $19.42 \pm 0.21$  та  $75.38 \pm 0.50$  мкм<sup>2</sup> (див. таблицю). У двох перших зонах кори наднирника під впливом мелатоніну вимірювані параметри були статистично вірогідно збільшеними, що корелює зі зростанням функціональної активності спонгіоцитів. У сітчастій ж зоні розмірні показники спонгіоцитів лишалися майже на контрольному рівні.

При введенні комбінації мелатоніну з антагоністом кіссептину згадані середні параметри спонгіоцитів у клубочковій зоні дорівнювали  $21.06 \pm 0.16$  та  $80.42 \pm 0.79$  мкм<sup>2</sup> відповідно. Таким чином, відбувалося статистично вірогідне зростання вимірюваних показників щодо контролю, але порівняно з групою, тваринам якої вводили мелатонін, вони були меншими. У пучковій зоні Пя складала в середньому  $25.03 \pm 0.20$ , а Ппк спонгіоцитів –  $97.4 \pm 0.76$  мкм<sup>2</sup>. Отже, спостерігалось відповідне зменшення досліджуваних параметрів порівняно з такими в групі без введення кіссептину, але щодо контролю відповідних змін не відмічалось. У сіт-

частій зоні згадані показники спонгіоцитів склали  $19.61 \pm 0.25$  та  $76.03 \pm 0.48$  мкм<sup>2</sup> (див. таблицю), тобто вірогідних змін параметрів як щодо контрольної групи, так і порівняно з групою з уведенням мелатоніну не спостерігалось.

Після комбінованого введення мелатоніну та кіссептину середня Пя спонгіоцитів клубочкової зони дорівнювала  $29.25 \pm 0.23$ , а Ппк клітин –  $91.16 \pm 0.91$  мкм<sup>2</sup>. У пучковій зоні відповідні показники спонгіоцитів становили  $34.17 \pm 0.39$  та  $163.68 \pm 2.03$  мкм<sup>2</sup>, а у сітчастій –  $25.69 \pm 0.24$  та  $95.85 \pm 1.18$  мкм<sup>2</sup> (див. таблицю). Отже, дані показники у трьох зонах кори наднирника були вірогідно більшими порівняно з контролем, а також з параметрами в групі з уведенням мелатоніну. Крім того, вимірювані параметри спонгіоцитів у всіх трьох зонах кори наднирника щурів вказаної групи досягали найвищих значень. Іншими словами, комбіноване введення мелатоніну з кіссептином чинило потужний активуючий вплив на клітини кори наднирника.

У клубочковій зоні середня Пя спонгіоцитів після введення мезатону дорівнювала  $18.59 \pm 0.16$  мкм<sup>2</sup>, а Ппк клітин –  $70.53 \pm 0.41$  мкм<sup>2</sup>, отже у даній групі щурів не спостерігалось статистично вірогідних змін досліджених параметрів щодо контролю. В пучковій зоні згадані показники спонгіоцитів склали  $25.57 \pm 0.19$  та  $102.23 \pm 0.48$  мкм<sup>2</sup>, а в сітчас-

тій –  $21.62 \pm 0.17$  та  $80.32 \pm 0.51$  мкм<sup>2</sup> відповідно (див. таблицю). Очевидно, що в двох останніх зонах кори наднирника відбувалося вірогідне зростання досліджуваних параметрів клітин після введення адrenomіметика мезатону.

Після комбінованого введення мезатону з антагоністом кіссептину середня Пя спонгіоцитів клубочкової зони становила  $18.51 \pm 0.16$ , а Ппк клітин –  $69.15 \pm 0.57$  мкм<sup>2</sup>. Отже, у досліджуваній групі не відбувалося вірогідних змін даних параметрів щодо контролю, але відмічалися нижчі показники, ніж у групі з уведенням мезатону. В пучковій зоні вказані показники спонгіоцитів склали  $19.19 \pm 0.22$  та  $78.08 \pm 0.51$  мкм<sup>2</sup>, а в сітчастій –  $18.45 \pm 0.22$  та  $70.19 \pm 0.73$  мкм<sup>2</sup> відповідно (див. таблицю). Таким чином, у двох останніх зонах кори наднирника спостерігалось вірогідне зменшення досліджуваних параметрів спонгіоцитів як щодо контролю, так і щодо групи з уведенням мезатону. Тобто P-234 помітно пригнічував активність спонгіоцитів пучкової та сітчастої зон наднирників, незважаючи на активуючу дію мезатону.

У щурів після введення празозину досліджувані параметри спонгіоцитів клубочкової зони склали в середньому  $17.77 \pm 0.16$  та  $62.16 \pm 0.31$  мкм<sup>2</sup>, у пучковій зоні –  $19.96 \pm 0.21$  та  $75.76 \pm 0.47$  мкм<sup>2</sup>, а в сітчастій –  $18.84 \pm 0.17$  та  $64.19 \pm 0.43$  мкм<sup>2</sup> відповідно (див. таблицю). Таким чином досліджувані параметри були вірогідно меншими, ніж у контролі, в усіх трьох зонах кори наднирника, що вказує на інактивуючий вплив празозину на спонгіоцити.

Після комбінованого введення празозину з кіссептином у клубочковій зоні середня Пя спонгіоцитів дорівнювала  $19.12 \pm 0.20$ , а Ппк клітин –  $70.98 \pm 0.50$  мкм<sup>2</sup>. Отже, щодо контролю вірогідних змін даних параметрів не було зафіксовано, але спостерігалось статистично вірогідне зростання досліджуваних показників щодо групи з уведенням празозину. У пучковій зоні згадані показники склали  $21.02 \pm 0.22$  та  $89.34 \pm 0.79$  мкм<sup>2</sup> відповідно. Це вказує на вірогідне зменшення досліджуваних показників спонгіоцитів щодо контролю, але спостерігалось зростання порівняно з групою з уведенням празозину. У сітчастій зоні середня Пя становила  $20.08 \pm 0.17$ , а Ппк спонгіоцитів –  $77.57 \pm 0.51$  мкм<sup>2</sup> (див. таблицю). Вірогідних змін даних показників щодо контролю не було зафіксовано, але відмічалось зростання порівняно з групою з уведенням празозину. Іншими словами, комбіноване введення кіссептину здатне припинити гальмівну дію празозину на спонгіоцити. При цьому в клубочко-

вій та сітчастій зонах в результаті комбінованого застосування празозину з кіссептином значення досліджуваних показників поверталися майже до контрольного рівня, а в пучковій зоні показники попри активуючий ефект кіссептину не досягали такого рівня.

У цілому можна констатувати, що клітини трьох зон кори наднирника не завжди однаково інтенсивно реагували на дію експериментальних агентів. Не виключено, що це пов'язано з різним функціональним значенням клітинних елементів цих зон. Варто зауважити, що в пучковій зоні кори наднирника завжди відмічалися найвищі розмірні показники спонгіоцитів незалежно від експериментальної групи тварин [25].

Спробуємо визначити важливість кіссептинергічної системи для модуляції функціонального стану кори наднирників. Кіссептин чинив інтенсивний стимулюючий вплив на спонгіоцити як при ізольованому введенні, так і при комбінації з іншими речовинами, причому він посилював активуючий ефект мелатоніну в усіх зонах наднирника та перешкоджав гальмівному впливу празозину (здебільшого в клубочковій та сітчастій зонах кори). Інші дослідники також відмічали активуючу дію кіссептину на клітини наднирників [26]. Активація клітин кори наднирників при ін'єкціях кіссептину може відбуватися в результаті стимулюючих впливів цього пептиду на рівні клітин гіпоталамуса, а саме нейронів ПВЯ. Стимуляція ПВЯ призводила до загальної активації ГГАС. Крім того, активація може реалізовуватись і на рівні гіпофіза, де кіссептин зв'язується з KISS1R в адренокортикотропцитах аденогіпофіза та активує їх. Також є дані, що кіссептин-13 при введенні дорослим самцям щурів значно підвищує базальний рівень кортикостерону та альдостерону і забезпечує зростання синтетичної та секреторної активності клітин пучкової та сітчастої зон наднирників [12]. Кіссептин може також активувати клітини кори надниркових залоз безпосередньо – впливаючи на KISS1R на поверхневих мембранах спонгіоцитів.

У той же час введення блокатора рецепторів кіссептину призводить до максимального пригнічення функціональної активності клітин усіх зон кори надниркових залоз. На тлі дії мелатоніну гальмівний ефект P-234 також проявляється, але в більшій мірі він притаманний спонгіоцитам клубочкової та пучкової зон кори наднирників. Слід підкреслити, що попри гальмівну дію P-234 на тлі впливу мелатоніну значення аналізованих показників не змен-

шувалися нижче контрольного рівня. При комбінованому введенні з мезатоном блокатор КР-234 чинить гальмівну дію здебільшого на клітини пучкової та сітчастої зон наднирників, зменшуючи аналізовані показники нижче контрольних значень. Інактивуючий ефект антагоніста кісспептину може базуватися на блокуванні рецепторів кісспептину в будь-якій із ланок ГГАС. Це призводить до зменшення інтенсивності синтезу та секреції кортиколіберину в гіпоталамусі та адренкортикотропіну в гіпофізі (а отже, і стероїдних гормонів, що синтезуються корою наднирників). Гальмівний ефект ін'єкцій Р-234 ми спостерігали в попередніх дослідженнях у клітинах преоптичного [27] та аркуатного [28] ядер гіпоталамуса, а також у гонадах [29].

Стосовно впливу екзогенного мелатоніну на функціональний стан клітин наднирників можна констатувати, що в цьому разі спонгіоцити клубочкової та пучкової зон активувалися. Проте при комбінованому введенні антагоніста кісспептину та мелатоніну аналізовані показники клітин у двох даних зонах наднирників помітно зменшувалися. Сітчаста зона наднирників майже не реагувала як на ізольоване введення мелатоніну, так і на його комбінацію з Р-234. Одночасне ж уведення мелатоніну з кісспептином призводило до потужної активації спонгіоцитів усіх трьох зон кори наднирників. Неоднозначність ефектів мелатоніну при його комбінованих уведеннях з блокатором рецепторів кісспептину та кісспептином як таким можна пояснити тим, що впливи мелатонінової та кісспептинергічної систем і на регуляторні системи головного мозку (зокрема, гіпоталамус і гіпофіз), і безпосередньо на ендокринні залози є до певної міри конкурентними [30].

$\alpha$ -Адренергічна система істотно впливає на функціональний стан кори наднирників. У результаті введення адреноміметика мезатону спостерігалась очевидна активація спонгіоцитів пучкової та сітчастої зон кори наднирників. В умовах же комбінованого введення Р-234 активуючий ефект мезатону в цих зонах кори наднирників практично усувався, і значення аналізованих показників спадали за межі контрольних. У клубочковій зоні при введенні як одного мезатону, так і його комбінації з антагоністом кісспептину істотних змін розмірних параметрів спонгіоцитів не відбувалося. Отже, мезатон не впливає (або майже не впливає) на функцію клітин клубочкової зони, але підвищує активність спонгіоцитів у сітчастій та пучковій зонах. Дані літератури вказують на те, що  $\alpha$ 1-адренорецептори у клітин кори наднирників,

очевидно, відсутні; тому мезатон, скоріш за все, діє на спонгіоцити не безпосередньо, а опосередковано – через ЦНС. Пригнічення функцій спонгіоцитів у пучковій і сітчастій зонах при комбінованому введенні мезатону з антагоністом кісспептину можна пояснити тим, що Р-234 блокує ефекти ендогенного кісспептину (останній бере участь у стероїдогенезі в даних зонах), а дія мезатону як агоніста  $\alpha$ 1-адренорецепторів не може компенсувати впливу цієї блокади.

На введення празозину спонгіоцити всіх трьох зон кори наднирників відповідали зниженням функціональної активності. При комбінованому введенні празозину з кісспептином гальмівний ефект празозину певною мірою усувався. В клубочковій та сітчастій зонах комбінований вплив празозину з кісспептином повертав значення аналізованих морфологічних показників до контрольного рівня, а в пучковій зоні ці показники ставали менше контрольних. В інших повідомленнях також вказувалося на гальмівну дію празозину на клітини кори наднирників, що зумовлено блокуванням  $\alpha$ -адренорецепторів [31]. Отже, блокування  $\alpha$ -адренергічної системи призводить до гальмування функції кори надниркових залоз у піддослідних тварин. Як можна припустити, істотною причиною цього є зменшення вивільнення власного кісспептину кісспептинергічними нейронами, котрі не отримують адекватної  $\alpha$ -адренергічної стимуляції на центральному рівні. Натомість певний активуючий ефект кісспептину проявляється в деякому зростанні розмірних показників спонгіоцитів у всіх зонах кори наднирників, незважаючи на одночасний вплив празозину.

Підсумовуючи отримані нами дані, можна зазначити, що введення кісспептину активує, а введення його блокатора – гальмує синтетичну активність клітин наднирника в усіх трьох досліджуваних зонах зазначеної залози; це відображується в зміні відповідних морфометричних показників. Отже, кісспептинергічна система здійснює загалом активуючий вплив на ГГАС. Подібний вплив на клітини кори наднирника чинить і екзогенний мелатонін, проте його активуючий вплив проявлявся лише в клітинах пучкової та клубочкової зон. Водночас поєднання дій двох стимулюючих чинників (мелатоніну та кісспептину) в усіх випадках призводило до потужнішої активації клітин усіх зон кори наднирника, в тому числі сітчастої. Натомість уведення Р-234 усувало активацію клітин пучкової зони, спричинену введенням мелатоніну. Подібні

дані вказують на те, що взаємодія впливів двох регуляторних систем на клітини трьох зон наднирків реалізується дещо по-різному. Регуляція клітин клубочкової зони двома досліджуваними системами опосередковується незалежними регуляторними шляхами; при цьому мелатонінова регуляція, як свідчать результати наших досліджень, виявилася потужнішою. Подібна схема реалізується і в разі регуляції функціонального стану спонгіоцитів пучкової зони, проте в даному випадку активуючий вплив мелатоніну скасовується введенням блокактора кіссептинергічних рецепторів. Інший характер взаємодії спостерігається щодо змін у клітинах сітчастої зони. Хоча ізольоване введення мелатоніну не викликало вірогідних зрушень досліджених морфометричних характеристик спонгіоцитів, комбіноване введення мелатоніну та кіссептину забезпечувало істотно потужнішу стимуляцію цих секреторних клітин наднирника. Іншими словами, мелатонін здійснює пермісивний вплив на кіссептинергічну систему в аспекті активації клітин сітчастої зони кори наднирника. Подібний характер взаємодії мелатонінової і кіссептинергічної систем спостерігався і в дослідженнях функціонального стану клітин преоптичного ядра гіпоталамуса [32].

$\alpha$ -Адренергічна система загалом здійснює активуючий вплив на клітини всіх трьох зон наднирника. Лише у клітин клубочкової зони під впливом мезатону морфометричні показники, котрі корелюють із їх синтетичною активністю, не зростають. Це може бути пов'язаним з високим вихідним рівнем впливу  $\alpha$ -адренергічної системи на дані клітини в умовах нашого дослідження. Блокування  $\alpha$ -адренорецепторів у всіх трьох зонах призводило до морфометричних змін, які вказують на зниження функціональної активності відповідних клітин.

Відміна спричиненої мезатоном активації клітин пучкової та сітчастої зон у результаті введення P-234 може свідчити про кіссептинзалежний характер дії  $\alpha$ -адренергічної системи в цьому випадку. Проте відсутність повної тотожності отриманих результатів та характер ізольованої дії P-234 змушують припускати наявність і прямого (кіссептиннезалежного) шляху активації клітин пучкової та сітчастої зон. При цьому, щоправда, ефект має меншу потужність. З іншого боку, гальмування кіссептинергічної системи після введення P-234 також не дозволяє виявитись активаційному впливу мезатону. Отже, для активації клітин пучкової та сітчастої зон необхідною умовою є активний (не-

заблокований) стан обох досліджуваних регуляторних систем ( $\alpha$ -адренергічної та кіссептинергічної). Клітини сітчастої зони в даному випадку демонструють дещо більшу залежність від стану кіссептинергічної системи. Наявність взаємозв'язку цих двох систем спостерігалася нами в попередніх дослідженнях на рівні преоптичного ядра гіпоталамуса [33].

Натомість у клітинах клубочкової зони зміна стану  $\alpha$ -адренергічної системи не може бути скоригована змінами в кіссептинергічній системі, що є свідченням явного домінування  $\alpha$ -адренергічної регуляції даних клітин. Звертає на себе увагу те, що регулюючий вплив екзогенного мелатоніну на ці ж самі клітини також є потужнішим, ніж ефекти кіссептинергічної регуляції (див. вище). Наявність взаємозв'язку впливів кіссептинергічної,  $\alpha$ -адренергічної та мелатонінової систем ми спостерігали в попередніх дослідженнях, де зазначені системи чинили модулюючі впливи на ГГАС [34].

У цілому, згідно з результатами нашого дослідження, можна сформулювати наступні висновки. Кіссептинергічна,  $\alpha$ -адренергічна і мелатонінова системи істотно впливають на функціональний стан клітин кори наднирників. При цьому впливи зазначених регуляторних систем проявляються в трьох зонах кори наднирників певною мірою специфічно. Для клітин клубочкової зони вирішальними є стан  $\alpha$ -адренергічної системи та наявність мелатоніну в достатній кількості, а вплив стану кіссептинергічної системи є другорядним. Клітини пучкової зони більшою мірою залежать від кіссептинергічної регуляції; водночас повноцінна активація клітин пучкової зони скасовується при блокуванні впливів як кіссептинергічної, так і  $\alpha$ -адренергічної системи. Клітини сітчастої зони кори наднирників найменше залежать від стану мелатонінової регуляції (вона забезпечує лише пермісивний ефект щодо кіссептинергічної системи). Водночас взаємодія  $\alpha$ -адренергічної та кіссептинергічної систем є необхідним фактором для повноцінної активації клітин сітчастої зони кори наднирників.

Результати нашого дослідження можуть знайти певне застосування при розробці фармакологічних препаратів, котрі призначені для корекції станів, викликаних дисфункцією досліджених регуляторних систем (зокрема, гіпо- і гіперфункцією наднирників). У той же час очевидно, що побічні та додаткові впливи експериментальних препаратів як на ГГАС, так і на інші системи органів потребують подальшого дослідження.

Дослідження виконувалось згідно з Положеннями Комітету з біоетики ННЦ «Інститут біології» при Київському національному університеті ім. Тараса Шевченка, а також з принципами, висуненими Міжнародною конвенцією із захисту тварин, що використовуються в експериментальних та інших наукових цілях (Страсбург, 1985).

Автори даної роботи – А. С. Безлюдна, А. С. Пустовалов, М. Г. Матвієнко та М. Е. Держинський – повідомляють про відсутність будь-яких конфліктів щодо комерційних або фінансових відносин, відносин з організаціями або особами, котрі будь-яким чином могли бути пов'язаними з дослідженням, а також взаємовідносин співавторів статті.

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. A. W. Tank and W. D. Lee, "Peripheral and central effects of circulating catecholamines," *Comp. Physiol.*, **5**, No. 1, 1-15 (2015).
2. В. М. Кеттайл, Р. А. Арки, *Патофизиология эндокринной системы*, Невский Диалект, Изд-во БИНОМ, СПб., Москва (2001).
3. S. Feldman, M. E. Newman, and J. Weidenfeld, "Effects of adrenergic and serotonergic agonists in the amygdala on the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis," *Brain Res. Bull.*, **52**, No. 6, 531-536 (2000).
4. A. Lymperopoulos, G. Rengo, and W. J. Koch, "Adrenergic nervous system in heart failure: pathophysiology and therapy," *Circ. Res.*, **113**, No. 6, 739-753 (2013).
5. M. Gedevanishvili, N. Mushkiashvili, and N. Gogitidze, "Cholinergic stimulation of adrenal medulla is essential for the granulicytopoietic response to lithium," *Georg. Med. News*, **207**, 43-46 (2012).
6. F. A. Kamal, J. G. Travers, and B. C. Blaxall, "G protein-coupled receptor kinases in cardiovascular disease: why "where" matters," *Trends Cardiovascul. Med.*, **22**, No. 8, 213-219 (2012).
7. C. de Lucia, G. D. Femminella, G. Gambino, et al., "Adrenal adrenoceptors in heart failure," *Front. Physiol.*, **7**, No. 5, 246 (2014).
8. F. A. Kamal, D. M. Mickelsen, K. M. Wegman, et al., "Simultaneous adrenal and cardiac g-protein-coupled receptor-gβγ inhibition halts heart failure progression," *J. Am. Coll. Cardiol.*, **63**, No. 23, 2549-2557 (2014).
9. M. S. Irwig, G. S. Fraley, J. T. Smith, et al., "Kisspeptin activation of gonadotropin releasing hormone neurons and regulation of KiSS-1 mRNA in the male rat," *Neuroendocrinology*, **80**, No. 4, 264-272 (2004).
10. N. Richard, S. Corvaisier, E. Camacho, and M. L. Kottler, "KiSS-1 and GPR54 at the pituitary level: overview and recent insights," *Peptides*, **30**, No. 1, 123-129 (2009).
11. S. Ramaswamy, R. B. Gibbs, and T. M. Plant, "Studies of the localisation of kisspeptin within the pituitary of the rhesus monkey (*Macaca mulatta*) and the effect of kisspeptin on the release of non-gonadotropic pituitary hormones," *J. Neuroendocrinol.*, **21**, No. 10, 795-804 (2009).
12. K. Csabafi, M. Jaszberenyi, Z. Bagosi, et al., "Effects of kisspeptin-13 on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, thermoregulation, anxiety and locomotor activity in rats," *Behav. Brain Res.*, **241**, No. 1, 56-61 (2013).
13. Y. S. Rao, N. N. Mott, and T. R. Pak, "Effects of kisspeptin on parameters of the HPA axis," *Endocrine*, **39**, No. 3, 220-228 (2011).
14. Y. Nakamura, S. Aoki, Y. Xing, et al., "Metastin stimulates aldosterone synthesis in human adrenal cells," *Reprod. Sci.*, **14**, No. 8, 836-845 (2007).
15. M. E. Dzerzhynsky, O. I. Gorelikova, and A. S. Pustovalov, "The interaction of the thyroid gland, pineal gland and immune system in chicken," *Reproduct. Biol.*, **6**, No. 2, 79-85 (2006).
16. N. L. McGuire, K. Kangas, and G. E. Bentley, "Effects of melatonin on peripheral reproductive function: regulation of testicular GnIH and testosterone," *Endocrinology*, **152**, No. 9, 3461-3470 (2001).
17. Z. Zamanian, M. Dehghani, and H. Hashemi, "Outline of changes in cortisol and melatonin circadian rhythms in the security guards of shiraz university of medical sciences," *Int. J. Prev. Med.*, **4**, No. 7, 825-830 (2013).
18. U. P. Zmrzljak, A. Korencic, R. Kosir, et al., "Inducible cAMP early repressor regulates the Period 1 gene of the hepatic and adrenal clocks," *J. Biol. Chem.*, **288**, No. 15, 1028-1037 (2013).
19. S. Gingerich, X. Wang, P. K. Lee, et al., "The generation of an array of clonal, immortalized cell models from the rat hypothalamus: analysis of melatonin effects on kisspeptin and gonadotropin-inhibitory hormone neurons," *Neuroscience*, **162**, No. 4, 1134-1140 (2009).
20. L. Ansel, M. Bolborea, A. H. Bentsen, et al., "Differential regulation of Kiss-1 expression by melatonin and gonadal hormones in male and female Syrian hamsters," *J. Biol. Rhythms*, **25**, No. 2, 81-91 (2010).
21. Е. В. Вторушина, Г. В. Брюхин, "Становление фолликулогенеза в яичниках у потомства крыс с хроническим поражением гепатобилиарной системы", *Пробл. репродукции*, **5**, No. 2, 23-26 (2005).
22. F. Chen, X. Chen, Z. Qiu, et al., "Functional analysis of a novel antagonistic antibody against the short epitope of the β1A-adrenergic receptor," *Cardiovascul. Res.*, **93**, No. 2, 280-290 (2012).
23. Е. Н. Чувашова, "Сравнительная оценка ксилазинового и кетаминного наркозов кошек", в кн.: *Тезисы докладов конференции "Актуальные проблемы биологии и ветеринарной медицины мелких домашних животных" (Троицк, 13-14 апреля 2000 г.)*, ч. 1, УГАВМ, Троицк (2000), с. 69-71.
24. M. E. Dzerzhynsky, N. V. Nuzhyna, and I. M. Vareniuk, "Morphometrical studies of reproductive system of birds after treatment with dopamine receptor blockers and melatonin," *Reproduct. Biol.*, **6**, No. 2, 87-92 (2006).
25. F. Mitani, "Functional zonation of the rat adrenal cortex: the development and maintenance," *Proc. Jpn. Acad. Ser. B. Phys. Biol. Sci.*, **90**, No. 5, 163-183 (2014).
26. K. Takahashi, I. Shoji, A. Shibasaki, et al., "Presence of kisspeptin-like immunoreactivity in human adrenal glands and adrenal tumors," *J. Mol. Neurosci.*, **41**, No. 1, 138-44 (2010).
27. M. G. Matvienko, A. S. Pustovalov, N. A. Buzynskaya, and N. E. Dzerzhinsky, "Morphofunctional modifications of cells of the preoptic hypothalamic nucleus of prepubescent rats under conditions of stimulation and blocking of the α-adrenergic and kisspeptinergic systems," *Neurophysiology*, **45**, Nos. 5/6, 417-422 (2013).



- N. E. Dzerzhinsky, "Morphofunctional changes of cells in the arcuate hypothalamic nucleus of prepubertal rats with a special reference to activation and blockade of alpha-adrenergic and kisspeptinergic systems," in: *Materials of the III International Conference "Science and Education" (Munich, April 25-26, 2013)*, Vol. 1, Munich (2013), pp. 273-277.
28. M. G. Matvienko, A. S. Pustovalov, and N. E. Dzerzhinsky, "Variety of functions and effects of kisspeptin," *Biopolymers Cell*, **29**, No. 1, 11-20 (2013).
29. А. Пустовалов, М. Матвієнко, М. Держинський, "Морфофункціональні зміни в тестикулах щурів під впливом кіссептину на фоні блокади та активації альфа-адренорецепторів і при введенні мелатоніна", *Вісн. Київ. нац. ун-ту ім. Тараса Шевченка. Сер. Біологія*, **1**, № 60, 41-43 (2012).
30. J. T. Cheng, I. M. Liu, D. H. Kuo, and M. T. Lin, "Stimulatory effect of phenylephrine on the secretion of beta-endorphin from rat adrenal medulla *in vitro*," *Auton. Neurosci.*, **93**, Nos. 1/2, 31-35 (2001).
31. M. G. Matvienko, A. S. Pustovalov, and N. E. Dzerzhinskii, "Age dynamics of cell reaction in the preoptic hypothalamic nucleus during melatonin administration with a special reference to blockade and activation of the kisspeptinergic system," *Adv. Gerontol.*, **27**, No. 1, 81-86 (2014).
32. М. Матвієнко, Р. Кривошеєв, Ю. Акімов та ін., "Морфофункціональні зміни клітин преоптичного ядра гіпоталамуса щурів при взаємодії  $\alpha$ -адренергічної та кіссептинергічної систем", *Вісн. Київ. нац. ун-ту ім. Тараса Шевченка. Сер. Біологія*, **2**, № 67, 62-65 (2014).
33. М. Г. Матвиенко, А. С. Пустовалов, Н. Э. Держинский, *Моноамины и коссептин в регуляции репродукции. Морфофункциональный анализ гипоталамо-гонадного комплекса*, LAP Lambert Acad. Publ., Saarbrucken (2014).