

Т. Галенова, канд. біол. наук, І. Николаева, студ.
Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина
К. Болибрух, асп., С. Половкович, канд. хим. наук, В. Новиков, д-р хим. наук
НУ "Львовская политехника", Львов, Украина

ВЛИЯНИЕ НОВОГО ТИОСУЛЬФОНАТНОГО ПРОИЗВОДНОГО ХИНОНА НА АДФ-ИНДУЦИРОВАННУЮ АГРЕГАЦИЮ ТРОМБОЦИТОВ

Авторами обнаружено, что S-((1,4-диметокси-9,10-диоксо-9,10-дигидроантрацен-2-ил)метил)-4-аминобензенсульфонотиоат владеет антитромбоцитарной активностью. Для выяснения механизма его антиагрегационного действия, провели серию дополнительных экспериментов. Было установлено, что соединение ингибирует АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов. Ингибирующий эффект зависит от концентрации препарата и времени преинкубации. Производное также оказывает дисагрегационное действие на агрегаты тромбоцитов предварительно сформированные в результате АДФ-стимуляции.

Ключевые слова: обогащенная тромбоцитами плазма, тиосульфатные производные хинона, АДФ-индуцированная агрегация тромбоцитов, антитромбоцитарные средства.

T. Halenova, PhD, I. Nikolaeva, stud.
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine,
K. Bolibrukh, PhD stud, S. Polovkovych, PhD, V. Novikov, DSc.
Lviv Polytechnic National University, Lviv, Ukraine

EFFECTS OF NOVEL QUINOID THIOSULFONATE DERIVATIVE ON ADP-INDUCED PLATELET AGGREGATION

Recently, in a large scale screening test, we have found that S-((1,4-dimethoxy-9,10-dioxo-9,10-dihydroanthracen-2-yl)methyl)4-aminobenzenesulfonothioate, a chemically synthesized thiosulfonate derivative of quinone, possessed an antiplatelet activity. To elucidate the mechanism of its antiplatelet action, a series of experiments were performed. The compound was found to inhibit the ADP-induced platelet aggregation. The inhibitory effect was dose-dependent on concentration and preincubation time. The derivative also disaggregated the preformed platelet aggregates induced by ADP.

Key words: platelet rich plasma, quinoid thiosulfonate derivative, ADP-induced platelet aggregation, antiplatelet agents.

УДК 591.147; 612.4

І. Варенюк, канд. біол. наук, Н. Нужи́на, канд. біол. наук,
В. Варенюк, студ. М. Дзержинський, д-р біол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ

ВПЛИВ МЕЛАТОНІНУ НА ГІПОТАЛАМО-АДРЕНАЛОВУ СИСТЕМУ ПТАХІВ: ЕФЕКТ БЛОКАДИ ДОФАМІНОВИХ D1-РЕЦЕПТОРІВ

Показано, що ввечері та вдень (але не вночі та вранці) дофамін через D1-рецептори може опосередковувати вплив мелатоніну на гіпоталамо-адреналовий комплекс птахів. Також дофамін через D1-рецептори може бути залучений до шляхів впливу мелатоніну на циркадну систему (супрахізматичне ядро та епіфіз) ввечері, але ці рецептори не залучені вночі, вранці та вдень.

Ключові слова: наднирники, гіпоталамус, епіфіз, мелатонін, дофамін, D1-рецептори.

Вступ. Циркадні ритми відіграють значну роль в життєдіяльності тваринного організму. Важливим компонентом системи, що задає добову ритміку в організмі хребетних, є епіфіз. Епіфіз секретує мелатонін з добовою періодичністю, задаючи цим самим добовий ритм роботи інших органів та систем органів [3]. З поглядом систем органів найбільш важливим є вплив мелатоніну на нейроендокринну систему, оскільки від її регуляторних впливів залежить злагоджена робота всіх інших систем в організмі. Однією зі складових нейроендокринної системи є гіпоталамо-гіпофізарно-адреналова система. На сьогодні завдяки численним дослідженням багато відомо про особливості впливу мелатоніну на гіпоталамо-гіпофізарно-адреналову систему [3, 5, 9, 10]. Проте спірні моменти залишаються, і не всі шляхи впливу цього епіфізарного гормону є до кінця з'ясованими. Зокрема, дослідження останніх років показали, що частина ефектів мелатоніну на гіпоталамо-гіпофізарно-адреналову систему може бути пов'язана з його впливом на синтез і виділення дофаміну, а останній вже діє безпосередньо через свої рецептори [4, 6, 7, 8, 11]. Для з'ясування можливості такої дії мелатоніну та дослідження ролі в цьому процесі дофамінових D1-рецепторів і проведено дане дослідження. Враховуючи наявність добової динаміки синтезу мелатоніну дослідження були проведені в 4 різних часових проміжках доби: вранці, вдень, ввечері та вночі.

Матеріали та методи досліджень. Дослідження було проведено на самцях японських перепелів (*Coturnix coturnix japonica*) 5-тижневого віку. Птахів утримували в умовах одного віварію на стандартному раціоні (їжа – комбікорм пташиний виробництва Київсь-

кого комбікормового заводу, вода – ad libitum, температура – +22-23 °C). Світловий режим: 14 годин – світло (з 7 до 21 години), 10 годин – темрява (з 21 до 7 години).

Було сформовано 16 експериментальних груп по 5 птахів у кожній групі. Їм у відповідний час доби одноразово давали: 1.) фізіологічний розчин вранці (о 7:00) (контрольна група); 2.) мелатонін вранці (о 7:00) в дозі 10 мкг (тут і далі всі дози вказані з розрахунку на 100 г маси тіла); 3.) R(+)-SCH 23390 гідрохлорид (блокатор дофамінових D1-рецепторів) вранці (о 6:00) в дозі 8 мкг; 4.) R(+)-SCH 23390 гідрохлорид вранці (о 6:00) в дозі 8 мкг, а через годину (о 7:00) в дозі 10 мкг; 5.) фізіологічний розчин вдень (о 13:00) (контрольна група); 6.) мелатонін вдень (о 13:00) в дозі 10 мкг; 7.) R(+)-SCH 23390 гідрохлорид вдень (о 12:00) в дозі 8 мкг; 8.) R(+)-SCH 23390 гідрохлорид вдень (о 12:00) в дозі 8 мкг, а через годину (о 13:00) мелатонін в дозі 10 мкг; 9.) фізіологічний розчин ввечері (о 19:00) (контрольна група); 10.) мелатонін ввечері (о 19:00) в дозі 10 мкг; 11.) R(+)-SCH 23390 гідрохлорид ввечері (о 18:00) в дозі 8 мкг; 12.) R(+)-SCH 23390 гідрохлорид ввечері (о 18:00) в дозі 8 мкг, а через годину (о 19:00) мелатонін у дозі 10 мкг; 13.) фізіологічний розчин вночі (о 1:00) (контрольна група); 14.) мелатонін вночі (о 1:00) в дозі 10 мкг; 15.) R(+)-SCH 23390 гідрохлорид вночі (в 0:00) в дозі 8 мкг; 16.) R(+)-SCH 23390 гідрохлорид вночі (в 0:00) в дозі 8 мкг, а через годину (о 1:00) мелатонін у дозі 10 мкг. Фізіологічний розчин вводили перитонеально в кількість 0,2 мл на птаха. R(+)-SCH 23390 гідрохлорид розчиняли у фізіологічному розчині і вводили за допомогою стереотаксичного приладу в порожнину третього шлуночка мозку. Мелатонін замішували у борошняні

кульки і давали перорально. Через 2 години після введення відповідного препарату птахів декапітували (групи 1-4 – о 9:00, групи 5-8 – о 15:00, групи 9-12 – о 21:00, групи 13-16 – о 3:00). Для досліджень брали гіпоталамічну область мозку, епіфіз, та наднирники. Їх фіксували в фіксаторі Буена. Потім отриманий матеріал заливали в парафін і виготовляли парафінові зрізи товщиною 5-6 мкм. Зрізи гіпоталамуса фарбували за методикою Ніссля, зрізи епіфіза – гематоксиліном Бемера, зрізи наднирників – гематоксиліном Бемера й еозинном [2]. Гістологічні препарати аналізували на світловому мікроскопі за допомогою окуляр-мікрометра МОВ-1-15х і морфометричної установки з використанням комп'ютерної програми Promorph-Paradise for Windows. На зрізах гіпоталамуса вимірювали діаметр ядер нейронів аркуатного, супрахіазматичного і паравентрикулярного ядер, на зрізах епіфіза – площу перетину ядер пінеалоцитів, на зрізах наднирників – ширину тяжів інтерренальної тканини. Зростання діаметра чи площі перетину клітинних ядер нейронів гіпоталамічних ядер та пінеалоцитів епіфіза вважали свідченням зростання функціональної активності клітин відповідного гіпоталамічного ядра чи епіфіза, а зменшення діаметра чи площі перетину клітинного ядра вважали свідченням зниження функціональної активності даної структури [1 – стор. 138]. Аналогічно зростання ширини тяжів інтерренальної тканини наднирників вважали свідченням зростання активності коркових структур надниркових залоз, а зменшення даного показника вважали ознакою зниження активності кори наднирників.

Статистичну обробку здійснювали методами варіаційної статистики за допомогою програмного забезпечення STATISTICA 5,0 for Windows. Вірогідність різниці між контрольними і дослідними групами оцінювали за t-критерієм Стюдента. Вірогідною вважали різницю між порівнюваними показниками при $P < 0,05$.

Результати досліджень та їх обговорення. Мелатонін вранці знижує, вдень і ввечері – не впливає, а вночі – підвищує ширину тяжів інтерренальної тканини у наднирниках (табл. 1). Неоднозначним є вплив мелатоніну при його введенні в різний час доби і на інші вивчені ланки гіпоталамо-гіпофізарно-адреналової системи (аркуатне і паравентрикулярне ядра гіпоталамуса)

(табл. 1). Також неоднаковим є вплив мелатоніну на дві ключові ланки циркадної системи птахів – супрахіазматичне ядро і епіфіз. Так, ранкове введення мелатоніну не змінює площі перерізу ядер пінеалоцитів епіфіза; в той час як в інші періоди доби цей параметр зростає (табл. 1). Діаметр ядер нейронів супрахіазматичного ядра гіпоталамуса зростає після ранкового, денного та вечірнього введення мелатоніну, однак не змінюється – після нічного введення мелатоніну (табл. 1). Можна помітити, що ввечері введення мелатоніну веде до підвищення діаметра нейронів аркуатного ядра; блокада дофамінових D1-рецепторів за допомогою R(+)-SCH 23390 гідрохлориду – не змінює цей параметр; проте при введенні мелатоніну на фоні заблокованих R(+)-SCH 23390 гідрохлоридом дофамінових D1-рецепторів діаметр нейронів аркуатного ядра знижується (табл. 1). Таку різницю ми не можемо пояснити простою сумациєю ефектів від введення мелатоніну та R(+)-SCH 23390 гідрохлориду, а тому можемо припустити існування взаємодії між мелатоніном та дофаміном при впливі на вищезгаданий параметр у цей час доби. Подібною є ситуація і при аналізі у вечірній час доби зміни таких морфометричних параметрів як діаметр ядер нейронів супрахіазматичного ядра та площі поперекового перетину ядер пінеалоцитів епіфіза, де активуючий вплив мелатоніну на ці параметри змінюється на гальмівний при його введенні після блокади дофамінових D1-рецепторів R(+)-SCH 23390 гідрохлоридом (табл. 1). Діаметр ядер нейронів паравентрикулярного ядра та ширина тяжів інтерренальної тканини наднирників не змінюються при вечірньому введенні мелатоніну та блокатора дофамінових D1-рецепторів R(+)-SCH 23390 гідрохлориду (табл. 1). Однак при введенні у цей час доби мелатоніну після блокади дофамінових D1-рецепторів R(+)-SCH 23390 гідрохлоридом спостерігається достовірне зниження діаметра ядер нейросекреторних клітин паравентрикулярного ядра та зростання ширини тяжів інтерренальної тканини наднирників (табл. 1). Отже, ввечері дофамінергічна система мозку може бути задіяна в реалізації ефектів мелатоніну на циркадну та гіпоталамо-адреналову системи із залученням дофамінових D1-рецепторів.

Таблиця 1. Морфометричні показники функціональної активності епіфіза і гіпоталамо-адреналової системи перепелів після введення мелатоніну та блокади дофамінових D1-рецепторів R(+)-SCH-23390 гідрохлоридом у різний час доби

Умови експерименту	Площа перетину ядер пінеалоцитів епіфіза, мкм ²	Діаметр ядер нейронів супрахіазматичного ядра гіпоталамуса, мкм	Діаметр ядер нейронів аркуатного ядра гіпоталамуса, мкм	Діаметр ядер нейронів паравентрикулярного ядра гіпоталамуса, мкм	Ширина тяжів інтерренальної тканини наднирників, мкм
ранкове введення препаратів					
фізіологічний розчин	19,8±0,7	7,2±0,2	7,7±0,1	7,2±0,6	39,6±0,5
мелатонін	19,1±0,2	8,0±0,1*	7,9±0,2	6,5±0,4	36,6±0,6*
R(+)-SCH-23390	18,8±0,4	7,0±0,1	6,7±0,1*	8,6±0,3	40,1±1,3
R(+)-SCH-23390 + мелатонін	19,4±0,6	8,2±0,1*	7,2±0,1*^	7,6±0,3^	36,4±1,4*
денне введення препаратів					
фізіологічний розчин	18,8±0,3	7,7±0,1	7,9±0,1	6,7±0,5	37,5±0,8
мелатонін	20,3±0,4*	8,6±0,1*	7,4±0,1*	8,6±0,4*	38,5±0,6
R(+)-SCH-23390	17,6±0,4*	7,3±0,1*	7,1±0,1*	7,8±0,3	41,4±1,3*
R(+)-SCH-23390 + мелатонін	21,5±0,5*	8,6±0,1*	7,4±0,1*	6,9±0,3^	34,1±1,6*^
вечірнє введення препаратів					
фізіологічний розчин	20,3±0,4	8,7±0,1	7,8±0,1	7,9±0,4	36,1±0,5
мелатонін	23,6±0,4*	9,5±0,1*	8,8±0,1*	9,1±0,6	36,1±0,5
R(+)-SCH-23390	19,3±0,3*	7,4±0,1*	7,6±0,1	7,8±0,4	37,0±2,1
R(+)-SCH-23390 + мелатонін	16,5±0,4*^	7,2±0,1*^	7,0±0,1*^	5,8±0,3*^	43,9±3,8*^
нічне введення препаратів					
фізіологічний розчин	18,7±0,4	8,5±0,1	7,2±0,1	9,1±0,5	35,0±0,4
мелатонін	23,2±0,4*	8,5±0,2	7,6±0,1*	6,3±0,4*	36,9±0,4*
R(+)-SCH-23390	18,9±0,4	7,3±0,1*	7,1±0,1	6,0±0,3*	29,2±3,2
R(+)-SCH-23390 + мелатонін	22,1±0,6*	8,8±0,1	7,4±0,1	7,3±0,3*	34,5±1,4

* – $P < 0,05$ (порівняно з відповідним параметром у контрольній групі в той же час доби).

^ – $P < 0,05$ (порівняно з відповідним параметром у групі, якій вводили лише мелатонін в той же час доби).

Також можна припустити існування вищеописаної взаємодії і при впливі мелатоніну на паравентрикулярне ядро гіпоталамуса та на наднирники вдень. Так, після денного введення мелатоніну спостерігається зростання діаметра ядер нейросекреторних клітин паравентрикулярного ядра. Але після денного введення мелатоніну і блокади D1-рецепторів спостерігається зниження діаметра ядер нейросекреторних клітин паравентрикулярного ядра гіпоталамуса. Така різниця не може бути пояснена впливом блокади D1-рецепторів R(+)-SCH 23390 гідрохлориду, оскільки його введення в цей час доби не змінює вищеописаний параметр (табл. 1). Аналогічно, ширина тяжів інтерренальної тканини наднирників не змінюється після денного введення мелатоніну, зростає після денного введення R(+)-SCH 23390 гідрохлориду, але знижується після денного введення мелатоніну та (+)-SCH 23390 гідрохлориду разом (табл. 1). Проте така взаємодія відсутня при впливі на циркадну систему піддослідних птахів, де діаметр ядер нейронів супрахіазматичного ядра та площа перетину ядер пінеалоцитів не відрізняються після денного введення мелатоніну та після денного введення мелатоніну фоні блокади дофамінових D1-рецепторів R(+)-SCH 23390 гідрохлоридом (табл. 1).

Вночі ефекти впливу мелатоніну на фоні блокади дофамінових D1-рецепторів на вивчені морфометричні параметри достовірно не відрізняються від ефектів введення тільки мелатоніну. Вранці вплив мелатоніну при блокаді дофамінових D1-рецепторів R(+)-SCH 23390 гідрохлоридом і без такої блокади на морфометричні параметри циркадної системи птахів (супрахіазматичне ядро та епіфіз) також не відрізняється. А достовірна різниця в цей час доби між діаметрами ядер нейронів аркуатного і паравентрикулярного ядер гіпоталамуса при введенні мелатоніну на фоні блокади дофамінових D1-рецепторів R(+)-SCH 23390 гідрохлоридом і введенні лише мелатоніну може бути пояснена сумациєю ефектів від введення мелатоніну та R(+)-SCH 23390 гідрохлориду, оскільки після введення мелатоніну та R(+)-SCH 23390 гідрохлориду разом отримано цифрові результати, проміжні між введенням мелатоніну та введенням R(+)-SCH 23390 гідрохлориду поодиночі (табл. 1). Отже, вночі та вранці дофамінові D1-рецептори не задіяні в реалізації ефектів мелатоніну на циркадну та гіпоталамо-адреналову системи піддослідних перепелів.

Висновки. Таким чином, мелатонін в різний час доби по-різному впливає на різні ланки гіпоталамо-адреналової та циркадної системи птахів. Встановлено існування значної синхронізації між активністю епіфіза і супрахіазматичного ядра гіпоталамуса, що є свідчен-

ням важливої ролі супрахіазматичного ядра у циркадній системі птахів. Найбільш ймовірно, що дофамінові D1-рецептори не залучені до шляхів впливу мелатоніну на систему супрахіазматичне ядро–епіфіз вночі, вранці та вдень, однак можуть бути залучені ввечері. Також показано, що частина ефектів мелатоніну на гіпоталамо-адреналовий комплекс птахів реалізується через дофамінергічну систему головного мозку із залученням дофамінових D1-рецепторів, але має особливості в різний час доби. Вночі та вранці дофамінові D1-рецептори мабуть не залучені, а ввечері та вдень – залучені до шляхів впливу мелатоніну на гіпоталамо-адреналовий комплекс.

Список використаних джерел

1. Загальна цитологія та гістологія / М. Е. Дзержинський, Н. В. Скрипник, Г. В. Островська та ін. – К., 2010.
2. Микроскопическая техника / под ред. Д. С. Саркисова, Ю. Л. Перова. – М., 1996.
3. Угрюмов М. В. Механизмы нейрорендокринной регуляции / М. В. Угрюмов. – М., 1999.
4. Alexiuk N. A. Melatonin increases the in situ activity of tyrosine hydroxylase in the mediobasal hypothalamus of male Syrian hamsters / N. A. Alexiuk, M. Uddin, J. Vriend // Life Sciences. – 1996. – Vol. 59, № 8. – P. 687–694.
5. Melatonin exerts direct inhibitory actions on ACTH responses in the human adrenal gland / C. Campino, F. J. Valenzuela, C. Torres-Farfan, H. E. Reynolds, L. Abarzua-Catalan, E. Arteaga et al. // Horm. Metab. Res. – 2011. – Vol. 43, № 5. – P. 337–342.
6. Dubocovich M. L. Functional MT1 and MT2 melatonin receptors in mammals / M. L. Dubocovich, M. Markowska // Endocrine. – 2005. – Vol. 27, № 2. – P. 101–110.
7. Exposito I. Dopamine-glutamic acid interaction in the anterior hypothalamus: Modulatory effect of melatonin / I. Exposito, F. Mora, S. Oaknin // Neuroreport. – 1995. – Vol. 6, № 4. – P. 661–665.
8. Serotonergic and catecholaminergic interactions with co-localised dopamine-melatonin neurons in the hypothalamus of the female turkey / S. W. Kang, B. Leclerc, L. J. Mauro, M. E. El Halawani // J. Neuroendocrinol. – 2009. – Vol. 21, № 1. – P. 10–19.
9. Madhu N. R. Pineal-adrenal interactions in domestic male pigeon exposed to variable circadian light regimes and exogenous melatonin / N. R. Madhu, C. K. Manna // Endocr. Regul. – 2010. – Vol. 44, № 3. – P. 121–127.
10. Pevet P. Melatonin: Both master clock output and internal time-giver in the circadian clocks network / P. Pevet, E. Challet // J. Physiol. Paris. – 2011. – Vol. 105, № 4–6. – P. 170–182.
11. Effects of D1- and D2-dopamine receptor activation on melatonin synthesis in bovine pinealocytes / C. Santanavanich, B. Chetsawang, M. Ebadi, P. Govitrapong // J. Pineal. Res. – 2003. – Vol. 35, № 3. – P. 169–176.

Надійшла до редколегії 25.09.14

И. Варениук, канд. биол. наук, Н. Нужина, канд. биол. наук, В. Варениук, студ., Н. Дзержинский, д-р биол. наук
Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина

ВЛИЯНИЕ МЕЛАТОНИНА НА ГИПОТАЛАМО-АДРЕНАЛОВУЮ СИСТЕМУ ПТИЦ: ЭФФЕКТ БЛОКАДЫ ДОФАМИНОВЫХ D1-РЕЦЕПТОРОВ

Показано, что вечером и днем (но не ночью или утром) дофамин через D1-рецепторы может опосредствовать влияние мелатонина на гипоталамо-адреналовый комплекс у птиц. Также дофамин через D1-рецепторы может быть задействован к путям влияния мелатонина на циркадную систему (супрахиазматическое ядро и эпифиз) вечером, но эти рецепторы не задействованы ночью, утром и днем.

Ключевые слова: надпочечники, гипоталамус, эпифиз, мелатонин, дофамин, D1-рецепторы.

I. Vareniuk, PhD., N. Nuzhyna, PhD., V. Vareniuk, stud., M. Dzerzhynsky, DSc.
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

INFLUENCE OF MELATONIN ON HYPOTHALAMIC-ADRENAL SYSTEM OF BIRDS: EFFECT OF DOPAMINERGIC D1-RECEPTORS BLOCKAGE

It was shown that dopamine via D1-receptors mediates the influence of melatonin on hypothalamic-adrenal axis in the evening and in the day, but it isn't in the morning and at the night. In addition dopamine via D1-receptors mediates the influence of melatonin on circadian system (suprachiasmatic nucleus and pineal gland) in bird in the evening.

Key words: adrenal gland, hypothalamus, pineal gland, melatonin, dopamine, D1-receptors. УДК 612.8; 612.82/83.