On the basis of the results indicating the influence of BIOMOS-VJ on the endocrine system of young and aged Wistar's rats it is assumed that this preparation has geroprotected properties.

Scientific and Production Joint
Venture «Biomos», Kharkov

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Бескровный А. М., Кулакова Г. С., Лысенко А. И.* Влияние высокополимерного металлосодержащего биостимулятора на иммунологическую реактивность организма экспериментальных животных // Журн. микробиологии, эпидемиологии, иммунобиологии.— 1979.— № 8.— С. 58—62.
2. *Божков А. П., Солодков А. П.* Зависимость адаптационного эффекта коротких стрессорных воздействий от тиреоидного статуса организма // Пробл. эндокринологии.— 1990.— 36, № 5.— С. 74—78.
3. *Виноградов В. В.* Гормоны, адаптация и системные реакции организма.— Минск : Наука и техника.— 1989.— 223 с.
4. *Гордиенко В. М., Стеченко Л. А., Бескровный А. М.* Ультраструктурные перестройки в миокарде при стрессе и действии адаптогена // Цитология и генетика.— 1989.— 23, № 1.— С. 3—6.
5. *Гордиенко В. М., Бескровный А. М., Рогоза В. М.* Реакция крупноклеточных ядер гипоталамуса в условиях иммобилизационного стресса. Проблемы физиологии гипоталамуса.— Киев : Наук. думка, 1987.— Вып. 12.— С. 99—105.
6. *Дардымов И. В.* Женьшень, элеутерококк (к механизму биологического действия).— М. : Наука, 1976.— 190 с.
7. *Никитин В. Н.* Эндокринный спектр организма при экспериментальном продлении жизни лабораторных животных периодическим сдерживающим рост питанием // Эндокринология сегодня : Сб. научн. тр.— Киев : Наук. думка, 1982.— С. 246—256.
8. *Тигранян Р. А.* Гормонально-метаболический статус организма при экстремальных воздействиях.— М. : Наука, 1990.— 286 с.
9. *Чердынцев С. Г., Барковская Г. А., Лопухова В. В.* Влияние родозина, пиридрола и экстракта элеутерококка на функцию коры надпочечников интактных животных // Стимуляторы центральной нервной системы.— Томск, 1968.— № 2.— С. 99—103.
10. *Чердынцев С. Г.* Физиологические механизмы действия некоторых стимуляторов ЦНС и роль эндокринного аппарата в реализации защитного влияния этих веществ : Автореф. дис. д-ра биол. наук.— Томск, 1970.— 33 с.
11. *Smith G. A., Pascoe W. S., Strorlien L. H.* Hypothalamic noradrenergic and sympathoadrenal control of glycemia after stress // Amer. J. Physiol.— 1989.— **256**, N 2, Pt. 1.— P. 231—235.
12. *Rattner B. A., Michael S. D., Altland P. D.* Age-related responses to mild restraint in the rat // J. Appl. Physiol. Respir. Environ. Exercise Physiol.— 1983.— **55**, N 5.— P. 1408—1412.

Сумісне наук.-виробниче
підприємство «Біомос», Харків

Матеріал надійшов
до редакції 03.09.91

УДК 612.432/.434.018:612.824.1

А. Г. Резников, С. М. МакКенн

Изменения секреции гормонов гипофиза при введении нейропептида Y в третий желудочек мозга

Уведення нейропептида Y(НПY) в третій шлуночок мозку нормальних та кастрованих самців пацюків зменшує секрецію пролактину та лютеінізуючого гормону (ЛГ), майже не впливає на секрецію фолікулостимулюючого гормону (ФСГ). Одночасно підсилюється реакція гіпофіза на ЛГ-рілізінг-гормон (ЛГ—РГ). Вплив НПY на виділення ЛГ у кастрованих тварин значно більше виражений, ніж у нормальних. Зроблен висновок про перевагу в ЦНС інгібіторної дії НПY по відношенню до нейроендокринної регуляції секреції гонадотропінів та пролактину.

Результати роботи дозволяють припустити участь НПY в фідбек-регуляції секреції ЛГ у самців.

Введение

В системе нейроэндокринной регуляции физиологических функций важное место занимает группа нейропептидов, тождественных по химическому строению некоторым гастроинтестинальным пептидам. Одним из них является нейропептид Y (НПY), состоящий из 36 аминокислотных остатков. Синтез и высокая концентрация НПY в гипоталамусе, совместная локализация его с катехоламинами в нейронах ствола мозга и наличие нервных окончаний в срединном возвышении, содержащих НПY, позволили предположить, что этот нейропептид причастен к нейроэндокринной регуляции секреции гипофизарных гормонов.

Изучение изменений секреции пролактина (ПЛ) у самцов крыс в ответ на введение в 3-й желудочек мозга НПY [8] или специфической антисыворотки к нему [12] привело к противоречивым результатам : вместо ожидаемых разнонаправленных изменений получены однонаправленные, а именно, уменьшение секреции гормона.

В опытах на самках крыс показано, что НПY вовлечен в проэструсный выброс лютеинизирующего гормона (ЛГ) [10, 16]. Далеко не столь однозначны данные о роли НПY в регуляции секреции ЛГ у самцов [1, 7, 8, 12]. Исходя из того, что кастрация самцов крыс приводит к уменьшению содержания НПY в гипоталамусе, а заместительная терапия тестостероном восстанавливает его [14, 15], мы предположили возможное участие нейропептида в регуляции секреции гонадотропинов тестикулярными андрогенами по типу отрицательной обратной связи.

Мы изучали секрецию фолликулостимулирующего гормона (ФСГ), ЛГ и ПЛ, а также гонадотропную реакцию организма на стимуляцию гипофиза ЛГ-рилизинг-гормоном (ЛГ-РГ) у ненаркотизированных свободно передвигающихся нормальных и кастрированных самцов крыс, которым вводили НПY в 3-й желудочек мозга.

Методика

Опыты выполнены на самцах крыс линии Спрэг-Доули (300—350 г), находившихся в индивидуальных клетках в стандартных условиях. За 8—9 сут до опыта всем животным под трибромэтаноловым наркозом имплантировали в 3-й желудочек мозга канюлю из нержавеющей стали с мандреном по ранее описанной стереотаксической методике [2] и координатам de Groot [6]. Правильность установки канюли контролировали по самопроизвольному вытеканию ликвора во время операции и проверяли по секционным срезам мозга после окончания опыта. За 24 ч до опыта под эфирным наркозом вводили силастиковый катетер в правую яремную вену и фиксировали его подшиванием к мышцам [9]. Часть животных кастрировали за 3 сут до опыта, а соответствующую контрольную группу подвергали ложной операции. Каждая группа состояла из 6—12 крыс.

За 1 ч до введения НПY катетер, находящийся в яремной вене, удлиняли полиэтиленовой трубкой, заполненной раствором гепарина (50 МЕ в 1 мл 0,9 % NaCl). Перед введением НПY из этой системы отбирали 0,4 мл крови для измерения базального содержания гормонов в плазме. Крысиный НПY (Peninsula Labs. Inc, 4 мкг), растворенный в 2 мкл апирогенного 0,9 % NaCl, медленно вводили в желудочек мозга с помощью шприца Гамильтона через иглу, установленную в направляющей канюле, без фиксации животного. Контрольным крысам вводили 2 мкл растворителя. Затем повторно, через каждые 15 мин, отбирали порции крови объемом 0,4 мл с немедленным замещением такой же по объему порцией гепаринового раствора. На 60-й минуте через катетер вводили синтетический ЛГ-РГ (25 нг в 0,25 мл 0,9 %-ного NaCl) и последовательно через 10-минутные интервалы брали 3 порции крови. Опыт заканчивали на 120-й минуте взятием последней порции крови. Плазму отделяли центрифугированием и хранили до анализа при —20 °С.

Содержание ЛГ, ФСГ и ПЛ в плазме крови определяли радиоиммунным методом с использованием предоставленных NIDDK (США) реагентов для крысиных гипофизарных гормонов. Включение радиоактивной метки (^{125}I) в гормональные препараты осуществляли хлораминовым методом [5]. Суммарную их секрецию оценивали по размеру площади, образованной кривой концентрации гормона и осью абсцисс в определенном промежутке времени (1 ч для ЛГ, ФСГ или 2 ч для ПЛ, ввиду нечувствительности лактотропоцитов к ЛГ-РГ) и выражали в нграммах на миллилитр за 60 мин или 120 мин. Достоверность различий между опытной и контрольной группами оценивали по критерию t Стьюдента, а между исходными и последующими значениями — методом парных сравнений.

Результаты и их обсуждение

Наиболее четкий результат воздействия НПY выявлен в отношении секреции ПЛ. При сравнении кастрированных и ложнооперированных самцов контрольной групп (внутрижелудочковое введение 0,9 % NaCl) не обнаружено достоверных различий ни по базальной концентрации ПЛ в плазме крови (7,91±1,24 и 5,25 нг/мл±0,70 нг/мл соответственно; $P>0{,}05$), ни по суммарной, за 120 мин (759±66 и 669 нг/мл±±82 нг/мл соответственно; $P>0{,}05$). Через 30 мин после введения НПY концентрация ПЛ в плазме крови снижалась вдвое как у крыс с интактными семенниками (в дальнейшем именуемых нормальными животными), так и у кастрированных (рис. 1, *а*). Она сохранялась низкой до конца эксперимента. Соответственно описанной динамике суммарная секреция ПЛ уменьшалась под влиянием НПY в 2,4 раза у нормальных и в 1,6 раза у кастрированных самцов (таблица).

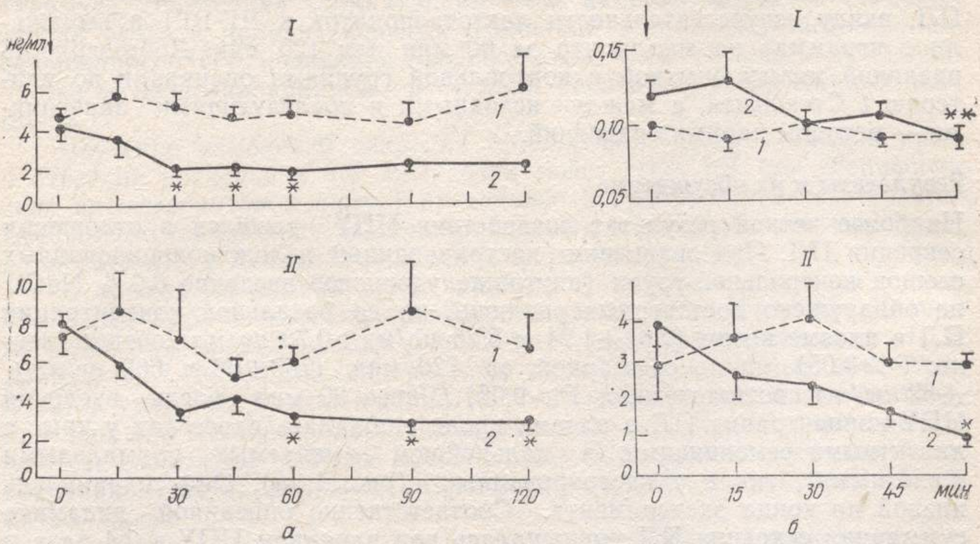
В отличие от секреции ПЛ, выраженность изменений секреции ЛГ в ответ на НПY была разной у нормальных и кастрированных крыс (см. рис. *1*, *б*). В первом случае НПY вызвал лишь слабое (на 25 %), но достоверное уменьшение концентрации ЛГ в плазме крови на 60-й минуте наблюдения по сравнению с исходными значениями концентрации без изменений суммарной. У кастратов на фоне резко повышенных по сравнению с ложнооперированными самцами значений базальной концентрации ЛГ (базальная: 3,40±0,54 против 0,20 нг/мл±0,02 нг/мл, $P<0{,}001$; суммарная за 60 мин: 198±39 против 14,6 нг/мл±2,2 нг/мл, $P<0{,}001$) НПY резко снижал концентрацию ЛГ в плазме крови этих животных. Через 1 ч после введения нейропептида среднее значение концентрации ЛГ было в 4,5 раза ниже исходного и в 3 раза меньше соответствующего контрольного значения. В связи с тем, что в предыдущие сроки взятия крови изменения концентрации ЛГ были не столь выражены, расчетное значение суммарной секреции ЛГ за 1 ч под воздействием НПY почти не изменялось (см. таблицу).

Влияние НПY на условный показатель секреции гормонов гипофиза у нормальных и кастрированных самцов крыс (M±m)

Условия опыта	Суммарная секреция гормона, нг/мл		
	за 120 мин	за 60 мин	
	Пролактин	Лютеинизирующий гормон	Фолликулостимулирующий гормон
	Нормальные крысы		
Введение 0,9 % NaCl (n=8)	588±92	5,5±0,15	387±42
Введение НПY (n=6)	257±30*	6,5±0,51	498±14**
	Кастрированные крысы		
Введение 0,9 % NaCl (n=8)	760±66	198±39	2099±214
Введение НПY (n=6)	488±49***	131±23	1645±250

* $P<0{,}01$; ** $P>0{,}05$; *** $P<0{,}002$.

Кастрация повышала в 3,9 раза концентрацию ФСГ в плазме по сравнению с ложной операцией, а суммарную секрецию — в 4,7 раза. Секреция ФСГ после внутрижелудочкового введения НПY у кастратов не изменялась. Зарегистрированное у нормальных крыс увеличение концентрации гормона на 15-й и 30-й минутах по сравнению с контролем (см. рис. *1, в*) и связанное с этим увеличение суммарной секреции



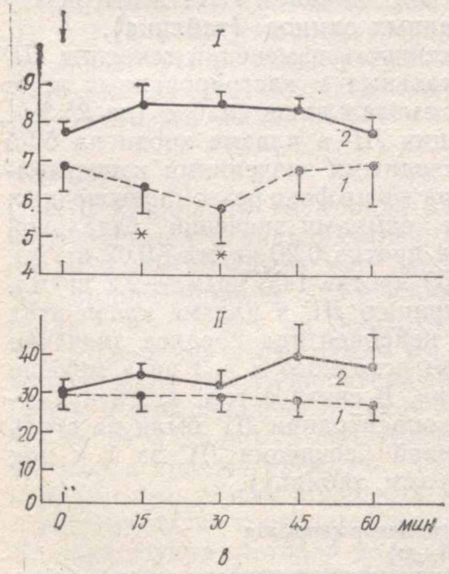


Рис. 1. Динамика (мин) секреции (нг/мл) пролактина (*а*), лютеинизирующего (*б*) и фолликулостимулирующего (*в*) гормонов в плазме крови нормальных (*I*) и кастрированных (*II*) самцов крыс: *1* — под влиянием 0,9 %-ного раствора NaCl (контроль); *2* — под влиянием раствора нейропептида Y (4 мкг), приготовленного на 0,9 %-ном растворе NaCl (2 мкл). *Стрелка* — момент введения растворов; *одна звездочка* — достоверность результата при $P<0{,}05$ по сравнению с контролем, *две звездочки* — достоверность результата при $P<0{,}05$ по сравнению с исходными значениями.

ФСГ (см. таблицу) столь незначительны (10 и 29 % соответственно), что их можно не принимать во внимание.

Весьма существенно, что под влиянием НПY возникали четкие изменения гонадотропной реакции гипофиза на ЛГ-РГ: у нормальных крыс установлено в среднем двукратное увеличение максимального прироста концентрации ЛГ относительно его значения перед введением ЛГ-РГ (рис. *2*). Устранение ингибиторного действия эндогенных андрогенов на гонадотропоциты кастрацией обусловило гиперреактивность гипофиза в тесте с ЛГ-РГ. Возможно, исходная гиперреактивность у кастратов маскирует облегчающее или сенсибилизирующее влияние НПY на чувствительность ЛГ-продуцирующих клеток гипофиза к ЛГ-РГ. Неожиданным оказалось достоверное усиление стимулирующего эффекта ЛГ-РГ по отношению к ФСГ у кастрированных самцов на фоне внутрижелудочкового введения НПY, что, по-видимому, отражает различия механизмов нейроэндокринной регуляции секреции ФСГ и ЛГ.

Таким образом, в нашей работе показано, что результатом непосредственного воздействия НПҮ на перивентрикулярные структуры мозга самцов крыс является уменьшение секреции ПЛ. Сравнение соответствующих показателей у нормальных и кастрированных животных свидетельствует о том, что этот эффект не зависит от андрогенной насыщенности организма, которая, как известно, резко уменьшается после кастрации. Ингибиторное влияние НПҮ на секрецию ЛГ, слабое и непостоянное у нормальных самцов, приобретает четко выраженный характер у кастрированных животных с высокой базальной гонадотропной активностью гипофиза, в то время как секреция ФСГ не изменяется. Это происходит, несмотря на вызываемую НПҮ сенсибилизацию гипофиза к стимулирующему действию ЛГ-РГ, обнаруженную нами в опытах in vivo. Ранее аналогичный эффект наблюдали in vitro на гипофизах, диспергированных гипофизарных клетках [4] или на колонках перфузируемых питуитоцитов [13]. По данным литературы [3], в монослойной культуре клеток аденогипофиза НПҮ усиливает продукцию ПЛ, т. е. действует противоположным образом по отношению к внутрижелудочковому его введению.

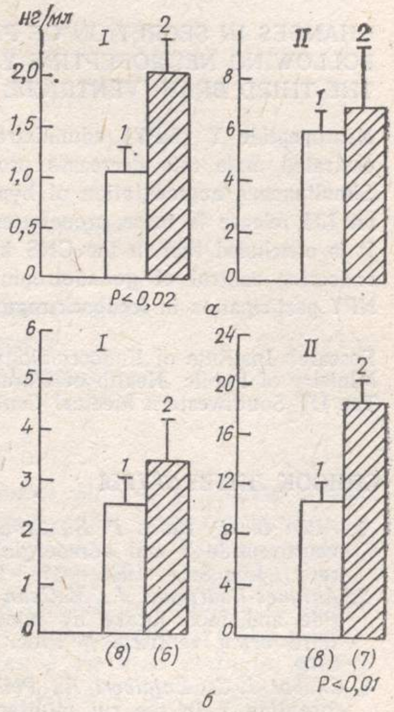


Рис. 2. Гонадотропная реакция (изменение концентрации лютеинизирующего — *а* и фолликулостимулирующего — *б* гормонов) на стимуляцию гипофиза ЛГ-рилизинг-гормоном у нормальных (*I*) и кастрированных (*II*) крыс: *1* — под влиянием 0,9 %-ного раствора NaCl (контроль); *2* — под влиянием раствора нейропептида Y (4 мкг), приготовленного на 0,9 %-ном растворе NaCl (2 мкл). В скобках указано число животных в группе.

Существует большая вероятность того, что НПҮ, инфузированный в ликвор 3-го желудочка мозга, достигает передней доли гипофиза через портальные сосуды и оказывает прямое действие на лакто- и гонадотропоциты. Однако при внутрижелудочковом введении модулирующее влияние НПҮ на секрецию ПЛ и ЛГ определяется главным образом его воздействием на нейроэндокринные структуры гипоталамуса. Наиболее вероятно, что в модуляцию вовлекаются норадренергические и дофаминергические звенья регуляции секреции гипофизарных гормонов. В конечном счете направленность вызываемых НПҮ изменений секреции ПЛ и ЛГ зависит от интеграции эффектов нейропептида в ЦНС и гипофизе. Исходя из результатов наших опытов, можно предположить, что в таком механизме нейроэндокринной регуляции секреции ПЛ и ЛГ источником ингибиторных влияний НПҮ является гипоталамус.

До сих пор остается недоказанным, что нейротрансмиттеры вовлечены в фидбек-регуляцию секреции гонадотропинов у самцов циркулирующими андрогенами. Хотя наиболее вероятными «претендентами» на эту роль были катехоламины, оказалось, что кастрация не изменяет содержания и оборота норадреналина и дофамина в участках мозга, содержащих ЛГ-РГ [11]. Обнаруженный нами угнетающий секрецию ЛГ эффект НПҮ у кастрированных самцов крыс демонстрирует явное сходство с известными эффектами введения тестостерона кастрированным животным. В сочетании с данными о противоположных изменениях концентрации НПУ в гипоталамусе кастрированных и андрогенизированных самцов [14, 15] эти наблюдения подтверждают наше предположение о причастности НПУ к реализации ингибиторного влияния андрогенов на секрецию ЛГ.

A. G. Reznikov, S. M. McCann

CHANGES IN SECRETION OF PITUITARY HORMONES FOLLOWING NEUROPEPTIDE Y ADMINISTRATION INTO THE THIRD BRAIN VENTRICLE

Neuropeptide Y (NPY) administration into the third brain ventricle of normal and castrated male rats decreases prolactin and LH secretion almost not affecting FSH. Simultaneous augmentation of hypophyseal response to LH-RH is observed. NPY effect on LH release is more pronounced in castrated animals as compared to normal ones. It is concluded that in the CNS inhibitory action of NPY prevails as regards to neuroendocrine control of gonadotropin and prolactin secretion. The obtained results allow NPY participation in feedback regulation of LH secretion in males.

Research Institute of Endocrinology and Metabolism,
Ministry of Public Health of Ukraine, Kiev
The UT Southwestern Medical Center at Dallas, USA

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Allen L. G., Kalra P. S., Crowley W. R., Kalra S. P.* Comparison of the effects of neuropeptide Y and adrenergic transmitters on LH release and food intake in male rats // Life Sci.— 1985.— 37.— P. 617—623.
2. *Antunes-Rodrigues J., McCann S. M.* Chemical stimulation of water, sodium chloride and food intake by injections of cholinergic and adrenergic drugs into the third brain ventricle // Proc. Soc. Exp. and Biol. Med.— 1970.— 133.— P. 1464—1470.
3. *Chabot J.-C., Enjalbert A., Pelletier G. et al.* Evidence for a direct action of neuropeptide Y in the rat pituitary gland // Neuroendocrinology.— 1988.— **47**, N 4.— P. 511—517.
4. *Crowley W. R., Hassid A., Kalra S. P.* Neuropeptide Y enhances the release of luteinizing hormone induced by luteinizing hormone-eleasing hormone // Endocrinology.— 1987.— **120**, N 3.— P. 941—945.
5. *Greenwood F. C., Hunter W. M., Glover J. S.* The preparation of I^{131} labelled human growth hormone of high specific radioactivity // Biochem. J.— 1963.— **89**.— P. 114—123.
6. *Groot de J.* The rat forebrain in stereotaxic coordinates.— Amsterdam : N. V. Noord-Hollandsche Uitgevers Maatschappij, 1959.— 40 p.
7. *Harfstrand A., Fuxe K., Agnati L. F. et al.* Studies on neuropeptide Y-catecholamine interactions in the hypothalamus and in the forebrain of the male rat // Neurochem. Int.— 1986.— 8.— P. 355—376.
8. *Harfstrand A., Eneroth P., Agnati L., Fuxe K.* Further studies on the effects of central administration of neuropeptide Y on neuroendocrine function in the male rat: relationship to hypothalamic catecholamines // Regulatory Peptides.— 1987.— **17**, N 3.— P. 167—179.
9. *Harms P., Ojeda S. R.* A rapid and simple procedure for chronic cannulation of the rat jugular vein // J. Appl. Physiol.— 1974.— **36**.— P. 391—392.
10. *Kalra S. P., Clark J. T., Sahu A. et al.* Hypothalamic NPY: A local circuit in the control of reproduction and behavior // Neuropeptide Y.— New York : Raven press, 1989.— P. 299—241.
11. *Liebmann J. E., Matsumoto A. M.* Acute selective withdrawal of testosterone negative feedback increases luteinizing hormone secretion without altering hypothalamic catecholaminergic neuronal activity // Endocrinology.— 1990.— **126**, N 1.— P. 555—564.
12. *McCann S. M., Rettori V., Milenkovic L. et al.* The role of neuropeptide Y (NPY) in control of anterior pituitary hormone release in the rat // Neuropeptide Y.— New York : Raven press, 1989.— P. 215—227.
13. *McDonald J. K., Lumpkin M. D., Samson W. K., McCann S. M.* Neuropeptide Y affects secretion of luteinizing hormone and growth hormone in ovariectomized rats // Proc. Natl. Acad. Sci.— 1985.— 82.— P. 561—564.
14. *Sahu A., Kalra S. P., Crowley W. R., Kalra P. S.* Testosterone raises neuropeptide Y concentration in selected hypothalamic sites and in vitro release from the medial basal hypothalamus of castrated male rats // Endocrinology.— 1989.— **124**, N 1.— P. 410—414.