

НО-ергічний контроль функції кровообігу у довгастому мозку щурів з експериментальним геміпаркінсонізмом за умов тривалого цілодобового освітлення

Л.М. Шаповал, Б.С. Коп'як, О.В. Дмитренко, В.О. Майський, О.П. Маньківська, В.Ф. Сагач

Інститут фізіології ім.О.О.Богомольця НАН України, Київ; e-mail: shapoval@biph.kiev.ua

Дослідження проведено на щурах з однобічним ушкодженням дофамінергічних (ДА) нейронів чорної субстанції (substantia nigra, SN) середнього мозку (експериментальний геміпаркінсонізм). Показано, що дегенерація ДА-нейронів SN супроводжується розвитком гіперактивності тих ДА-рецепторів, що залишилися неушкодженими і реагують на апоморфіновий (Аро) тест обертальними рухами. Асиметрія рухової поведінки тварин чітко корелює з рівнем ушкодження нейронів SN, що підтверджує морфологічний аналіз дегенеративних змін ДА-нейронів SN. Після введення 6-ГОДА у SN 42,6% тварин демонстрували інтенсивні Аро-індуковані обертальні рухи (понад 180об/30хв), що згідно з результатами морфологічного аналізу відповідало руйнуванню 90 % ДА-нейронів у цій ділянці мозку. Ін'єкції L-аргініну у медулярні ядра (обопільне ядро, латеральне ретикулярне ядро і парамедіанне ядро) цих щурів супроводжувалися розвитком менш виражених змін системного артеріального тиску порівняно з контролем. При цьому значно підвищувалась активність індукційної NO-синтази, в той час як активність її конститутивної ізоформи мала тенденцію до зниження порівняно з такою у контрольних щурів. Виявлено, що в умовах тривалого (3 тиж) цілодобового освітлення тварин (кольорова температура 2700К, світловий потік 180лм, інтенсивність освітлення 40лк) зменшується кількість неушкоджених або недостатньо ушкоджених нейронів: 35,0% (щодо 53,8% в контролі) не виявили поведінкової асиметрії в Аро-тесті. Значно зменшилась активність конститутивної NO-синтази у довгастому мозку, міокарді і мітохондріях серця, що призвело до пригнічення *de novo* синтезу NO. Зокрема цей показник знизився у гомогенаті довгастого мозку більше ніж вдвічі ($2,46 \pm 0,80$ нмоль / хв ($P < 0.05$) порівняно з $5,44 \pm 0,35$ нмоль / хв у контрольних щурів). Отримані результати свідчать про те, що при експериментальному геміпаркінсонізмі знижується медулярний НО-ергічний контроль функції кровообігу у щурів, а тривале цілодобове освітлення тварин поглиблює негативний вплив дегенерації ДА-нейронів SN.

Ключові слова: оксид азоту; довгастий мозок; чорна субстанція; освітлення.

ВСТУП

Хвороба Паркінсона є однією із найбільш розповсюджених нейродегенеративних захворювань центральної нервової системи. Вона зумовлена прогресуючою дегенерацією дофамінергічних (ДА) нейронів екстрапірамідної системи (базальні ядра, чорна субстанція, блакитна пляма тощо), найбільшою мірою дегенеративні зміни спостерігаються у передніх

відділах чорної субстанції (substantia nigra, SN) середнього мозку. На цей час доведено, що типові для хвороби Паркінсона симптоми у людини виникають при загибелі 60–80% нейронів цього анатомічного утворення, причому дегенеративні зміни супроводжуються вегето-вісцеральною дисфункцією, в тому числі розладами діяльності серцево-судинної системи [1-4]. Зокрема, у тварин з хронічним дефіцитом нігростріатного дофаміну пору-

© Л.М. Шаповал, Б.С. Коп'як, О.В. Дмитренко, В.О. Майський, О.П. Маньківська, В.Ф. Сагач

шується систолічна і діастолічна функція серця, збільшується жорсткість міокарда, підвищується чутливість мітохондріальної пори (МП) до відкривання [2]. Вважають, що нітрозативний стрес відіграє важливу роль у патогенезі хвороби Паркінсона на тій підставі, що у SN виявлено надмірно високий вміст нейрональної і індукцйбельної NO-синтази (cNOS та iNOS відповідно) [3,4], що може викликати цитотоксичні зміни у мозку. Рівні активності цих ензимів і відповідно продукції оксиду азоту (NO) у довгастому мозку, який традиційно вважається важливим центром регуляції функції кровообігу, ще не з'ясовані. Накопичена величезна кількість даних [5–9], які свідчать про залучення NO у медулярний контроль діяльності серцево-судинної системи як гальмівного трансмітера. У довгастому мозку ідентифіковано велику кількість NO-синтезувальних нейронів [10, 11]. Відомо, що NO взаємодіє з багатьма ендogenousними агентами, зокрема з гормоном епіфіза мелатоніном [12]. Чисельні дослідження вказують на те, що цей гормон залучається у регуляцію серцево-судинної системи [13–20]. Про значення мелатоніну в регуляції діяльності серцево-судинної системи свідчить наявність циркадного ритму артеріального тиску та частоти серцевих скорочень у людини [13, 14], його участь у поліпшенні гемодинаміки, скоротливої активності міокарда і судинної реактивності [15–18], зменшенні розміру інфаркту і апоптотичної загибелі кардіоміоцитів [19]. Отримані також інтригуючі дані про те, що мелатонін є інгібітором відкриття МП, і попередження цього процесу за допомогою мелатоніну сприяє кардіопротекції у старих щурів [2, 20], тому слушним є припущення, що дефіцит гормону негативно впливає на діяльність серцево-судинної системи. Найбільш потужним синхронізатором синтезу мелатоніну вважається світло. Відомо, що при денному освітленні синтетичні і секреторні процеси в епіфізі пригнічуються, а в темряві посилюються [13, 14]. Можна очікувати, що тривале порушення циклу

день-ніч за допомогою штучного освітлення приміщення погіршить регуляцію функції кровообігу кардіоваскулярними нейронами довгастого мозку щурів.

Мета нашої роботи - оцінити особливості NO-ергічного контролю діяльності серцево-судинної системи нейронами довгастого мозку щурів із дефіцитом дофаміну у SN при тривалому освітленні тварин.

МЕТОДИКА

Дослідження проведено на щурах-самцях лінії Вістар масою 200–350 гр згідно з Європейською директивою ради громад від 24 листопада 1986 р. (86/609/ЕЕС; Страсбург).

Модель експериментального геміпаркінсонізму. Експерименти здійснювали під нембуталовим наркозом (50 мг/кг, внутрішньоочеревинно, «Sigma», США). Всі використані в роботі препарати були цієї фірми. Геміпаркінсонізм розвивався внаслідок введення 6-гідроксидофаміну (6-ГОДА, 8 мкг) у лівий медіальний пучок переднього мозку [21] згідно з стереотаксичними координатами [22], що викликало одностороннє ушкодження ДА-нейронів у SN. Препарат вводили через скляну мікропіпетку (діаметр кінчика не перевищував 100 мкм), прикріплену до мікроін'єктора. Перед введенням нейротоксин розчиняли в 4 мкл 0,9% -го охолодженого льодом фізіологічного розчину. Щоб запобігти окисненню препарату, додавали 0,1%-й розчин аскорбінової кислоти. Для пригнічення метаболічної трансформації 6-ГОДА моноаміноксидазою, щурам вводили паргілін (40 мг/кг, внутрішньоочеревинно за 30 хв до ін'єкції нейротоксину. Крім того, дезипрамін (25 мг/кг) вводили внутрішньоочеревинно для запобігання поглинання 6-ГОДА норадренергічними нейронами. Ін'єкції 6-ГОДА призводили до гіперактивності ДА-рецепторів [23, 24]. Через тиждень після операції усіх тварин піддавали скринінгу з використанням агоніста ДА-рецепторів апоморфіну (Аро, 0,5 мг/кг, внутрішньоочеревинно) для перевірки рівня

ушкодження нейротоксином ДА-нейронів SN. Ін'єкції Аро щурам з однобічним ураженням нігровіаційної ДА-системи викликають обертальні рухи в контралатеральний бік ушкодженої половини мозку [24]. Залежно від середньої частоти обертів за 30 хв спостереження, дослідні тварини в кожній групі були розділені на три підгрупи, а саме: щури, які здійснювали понад 180 обертів (підгрупа I), менше ніж 180 обертів (підгрупа II) і щури без поведінкової асиметрії, 0 обертів (підгрупа III). Оскільки інтенсивність рухів залежить від ступеня поширення ураження SN, ця модель є зручним підходом для отримання примусових рухів тварин різної інтенсивності. Такі закономірності асиметрії рухової поведінки тварин у підгрупах чітко корелюють з рівнем ушкодження нейронів SN, що було підтверджено за допомогою морфологічного контролю.

Морфологічний аналіз дегенеративних змін ДА-нейронів SN. За допомогою світлової мікроскопії досліджували три ділянки SN, а саме: *substantia nigra compacta* (SNC), *substantia nigra lateralis* (SNL) і *substantia nigra medialis* контрольних щурів і щурів із 6-ГОДА-індукованою дегенерацією ДА-нейронів на рівні 5,60 мм каудально від Bregma згідно з атласом [22]. Фронтальні зрізи мозку товщиною 40мкм фарбували крезил віолетом. ДА-нейрони виявляли у зрізах мозку при збільшенні у 100 і 250 разів за блакитним забарвленням їх цитоплазми та відростків. Інтенсивно забарвлювалися також ядра гліальних клітин.

Освітлення тварин. Приміщення, в якому перебували щури, освітлювали цілодобово протягом 3 тиж. Для цього використовували спіральну лампу (Delux 2700K T4 Full Spiral; 230В, 32Вт, 1800лм, 2700К), світловий потік якої становив 1800лм, кольорова температура - 2700К, і інтенсивність освітлення 40 лк. Усі щури (n=30) були розміщені у віварії і регулярно забезпечувалися свіжою підстилкою, їжею і водою. Контрольну групу щурів тримали на стандартній дієті і в умовах природного циклу день–ніч.

Дослідження медулярного нервового контролю. Експерименти проводили на щурах під уретановим наркозом (1,7г/кг, внутрішньоочеревинно, n=20). Після фіксації голови тварини у стереотаксичному приладі СЕЖ-3, модифікованому для роботи на дрібних тваринах, здійснювали часткову трепанацію черепа і відкривали дорсальну поверхню довгастого мозку. Вся хірургічна процедура тривала 20–25хв. Фармакологічні агенти вводили в ядра довгастого мозку, які безпосередньо залучені у нервовий контроль функції кровообігу (парамедіанне ядро–PMn; обопільне ядро–AMB; латеральне ретикулярне ядро–LRN) в об'ємі 100 нл, за допомогою мікрошприця з каліброваним мікрометричним гвинтом, згідно з стереотаксичними координатами атласу щура [22]. В медулярні ядра довгастого мозку ін'єкували L-аргінін (10^{-10} – 10^{-6} моль/л, «Sigma», США) для активації nNOS. Специфічний антагоніст nNOS 7-нітроіндазол (30мг/кг, «Sigma», США) вводили внутрішньоочеревинно за 30 хв до початку досліду. Системний артеріальний тиск (CAT) вимірювали у сонній артерії за допомогою катетера, заповненого гепаринизованим фізіологічним розчином. Гепарин (500 од / kg^{-1}) був використаний для запобігання розвитку тромбів. Всі біохімічні показники контролювали у гомогенатах довгастого мозку, серця і мітохондріях серця.

Для визначення активності NOS (Ca^{2+} -залежної та Ca^{2+} -незалежної) використовували класичний метод [25] у модифікації [26], за допомогою спектрофотометричного вимірювання продукту реакції – L-цитруліну. Сумарну активність NOS (cNOS+iNOS визначали у пробах, що містили 0,5–1 мг білка, які інкубували в загальному об'ємі 1 мл субстратної суміші наступного складу (мкмоль/мл): KH_2PO_4 - 50, MgCl_2 -1, CaCl_2 - 2, НАДФН (“Sigma”, США) - 1, L-аргінін - 2, при закисненні розчину до pH 7,0, протягом 60 хв при 37°C. Суміш центрифугували протягом 10 хв і в надосадковій безбілковій суміші визначали вміст L-цитруліну висо-

коспектифічним спектрофотометричним методом за кольоровою реакцією з антипірином. Для визначення активності Ca^{2+} -незалежної iNOS в інкубаційну суміш замість CaCl_2 додавали 2 мкмоль ЕДТА. Активність cNOS (eNOS+nNOS) вираховували, віднімаючи значення активності iNOS від сумарної активності NOS.

Активність аргінази визначали методом, який базувався на оцінці утворення сечовини в інкубаційній суміші [27], що містила L-аргінін і аліквоти проб в тріс- HCl -буфері (рН 8,0). Інкубацію проводили при 37°C протягом 60хв, а реакцію зупиняли, додаючи 0,3мл 2N HClO_4 . Осадок у буфері видаляли центрифугуванням та в надосадковій фракції визначали вміст сечовини, що утворилася.

Статистичний аналіз отриманих результатів проводили із використанням стандартних програмних пакетів Excel та Origin 7.0 (MS Office XP). Всі результати виражені у вигляді середнього значення \pm SEM. Вірогідність відмінностей між контрольною та дослідною групами оцінювали за критерієм t Стюдента. При порівнянні середньої кількості забарвлених клітин SN використовували статистично дисперсійний аналіз ANOVA. Значення $P < 0,05$ вважали статистично значущими.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Дегенеративні зміни у ДА-нейронах SN оцінювали за допомогою поведінкового Аро-тесту і морфологічного аналізу дегенерації. Слід зазначити, що Аро-індукована асиметрія рухової поведінки тварин виникає тільки тоді, коли понад 80% ДА-продукуючих нейронів SN гинуть, оскільки при ушкодженні невеликої кількості клітин компенсаторні механізми, спрямовані на збереження концентрації дофаміну в цій структурі, перешкоджають розвитку індукованої дегенерацією гіперчутливості. В останньому випадку, відбувається надмірно швидке зростання і переорієнтація процесів, збільшення секреторної активності тих ДА-синтезувальних клітин, які зали-

шаються неушкодженими після часткового руйнування ДА-системи [23]. У дослідженнях, проведених на 197 щурах лінії Вістар, яким вводили у мозок нейротоксин 6-ГОДА, 84 щура (42,6%) демонстрували інтенсивні Аро-індуковані обертальні рухи за 30 хв (понад 180 об); у 7 тварин (3,6%) рухова активність була незначною (менше ніж 180 об) і у 106 тварин (53,8%) обертальні рухи не спостерігали (рис. 1). За результатами морфологічного аналізу, ДА-синтезувальні нейрони SN середнього мозку зруйновані в цих групах на 90, 86 і 44% відповідно. Саме тому Аро-індуковані обертальні рухи спостерігаються тільки в перших двох підгрупах і не відмічаються в третій.

На мікрофотографіях фронтальних зрізів компактної, латеральної і медіальної зон SN контрольних щурів чітко видно велику кількість забарвлених крезил віолетом ДА-нейронів (рис.2, а–в), найбільша кількість яких відмічається у компактній SN (SNC) (див. рис.2, є). Введення нейротоксину 6-ГОДА супроводжується значним зниженням кількості забарвлених нейронів на боці дегенерації (зліва; див. рис.2, г–е). Слід відмітити, що у всіх трьох досліджених зонах SN дегенера-

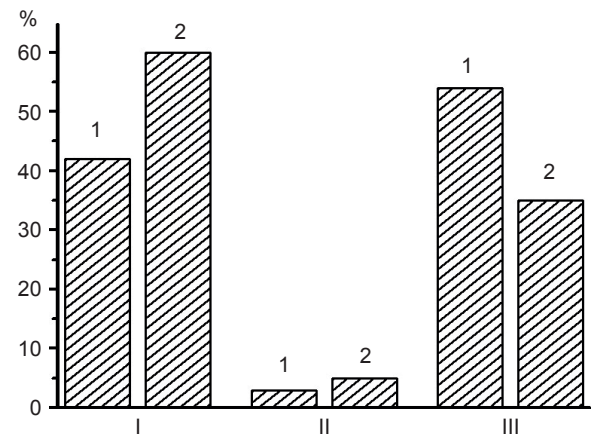


Рис. 1 Вплив тривалого цілодобового освітлення на рухову активність щурів з експериментальним геміпаркінсонізмом (апоморфіновий тест): I – кількість щурів, які реагують інтенсивними ротаційними рухами, II – кількість щурів, які реагують менш інтенсивними ротаційними рухами, III – кількість щурів, які не реагують ротаційними рухами; 1-6-ГОДА, 2- 6-ГОДА та освітлення

тивні зміни відмічалися у 90 % ДА-нейронів (див. рис.2,ж).

Отже, 6-ГОДА-індуковане ушкодження ДА-нейронів SN, яке лежить в основі експериментального геміпаркінсонізму, підтверджують поведінкова асиметрія рухової активності в Аро-тесті і морфологічний аналіз руйнування значної частини (90%) ДА-синтезувальних нейронів.

Особливості медулярного NO-ергічного кардіоваскулярного контролю у щурів з експериментальним геміпаркінсонізмом. При хворобі Паркінсона у SN людини надмірно посилюється продукція NO за рахунок надмірної активації ізоформ nNOS і iNOS [4]. Подібно до результатів, отриманих для SN, у довгастому мозку таких щурів ми спостерігали значне (на 254,3 %, від $1,4 \pm 0,13$ до $4,96 \pm 0,22$ пмоль/хв.; $P < 0,05$) підвищення активності iNOS, що

є очікуваним і свідчить про розвиток нітративного стресу. Водночас, на відміну від SN, у довгастому мозку щурів із дефіцитом ендogenous ДА спостерігається тенденція до зниження активності cNOS порівняно з такою у контрольних тварин. Зокрема, активність cNOS у довгастому мозку щурів з експериментальним геміпаркінсонізмом знижується на 24,8% ($P > 0,05$), від $5,44 \pm 0,35$ пмоль / хв у контролі до $4,09 \pm 0,13$ ($P > 0,05$), що сприяє зниженню конститутивного синтезу NO (рис.3). Оскільки у нейронах ЦНС експресується переважно nNOS, а eNOS експресується тільки в астроцитах і ендотеліальних клітинах мозкових судин [28], слід вважати, що при дефіциті нігостріатного дофаміну синтез NO в нейронах довгастого мозку зменшується за рахунок пригнічення активності саме nNOS.

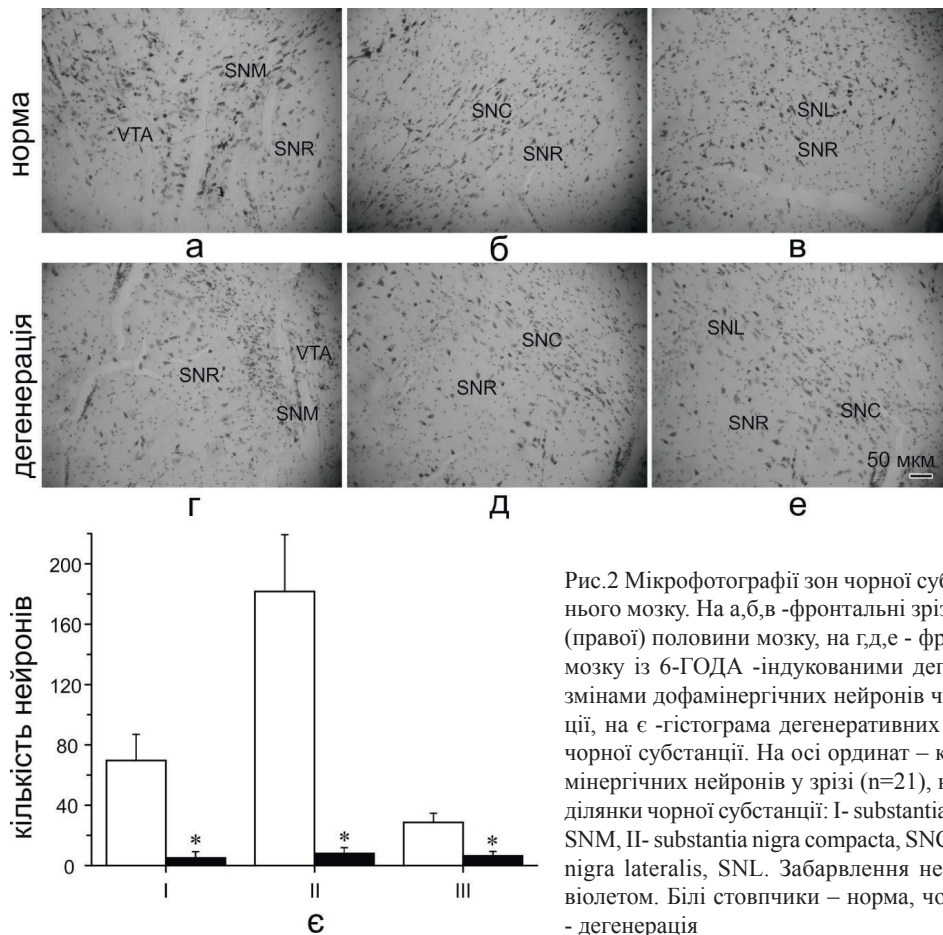


Рис.2 Мікрофотографії зон чорної субстанції середнього мозку. На а,б,в -фронтальні зрізи контрольної (правої) половини мозку, на г,д,е - фронтальні зрізи мозку із 6-ГОДА -індукованими дегенеративними змінами дофамінергічних нейронів чорної субстанції, на є -гістограма дегенеративних змін нейронів чорної субстанції. На осі ординат – кількість дофамінергічних нейронів у зрізі (n=21), на осі абсцис – ділянки чорної субстанції: I- substantia nigra medialis, SNM, II- substantia nigra compacta, SNC, III- substantia nigra lateralis, SNL. Забарвлення нейронів крезил біолоетом. Білі стовпчики – норма, чорні стовпчики – дегенерація

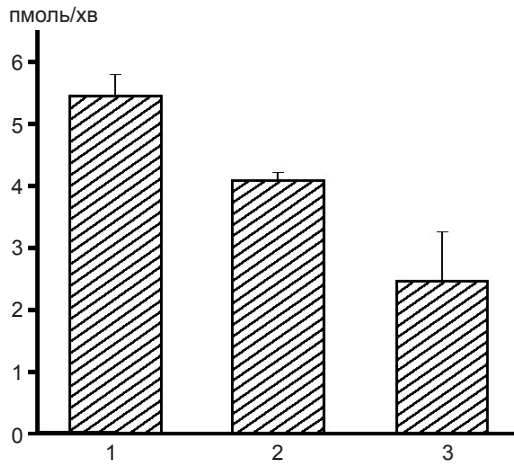


Рис. 3. Активність конститутивної NO-синтази у довгастому мозку щурів з експериментальним геміпаркінсонізмом: 1- контроль, 2- після дегенерації дофамінергічних нейронів, 3- після дегенерації дофамінергічних нейронів на фоні цілодобового освітлення тварин впродовж 3 тиж

Треба зазначити, що результати біохімічних досліджень добре узгоджуються з фізіологічними. Так, активація nNOS у щурів з експериментальним геміпаркінсонізмом за допомогою ін'єкцій L-аргініну у медулярні ядра, які залучені у нервовий контроль функції кровообігу, супроводжувалася значним послабленням гіпотензивних ефектів, порівняно з контролем. Так, у щурів з експериментальною хворобою Паркінсона ін'єкції L-аргініну (10^{-10} моль/л) в AMB, LRN

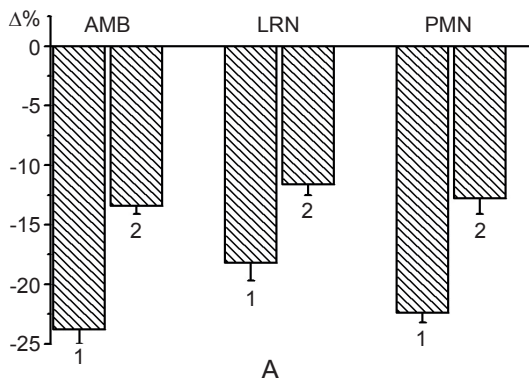


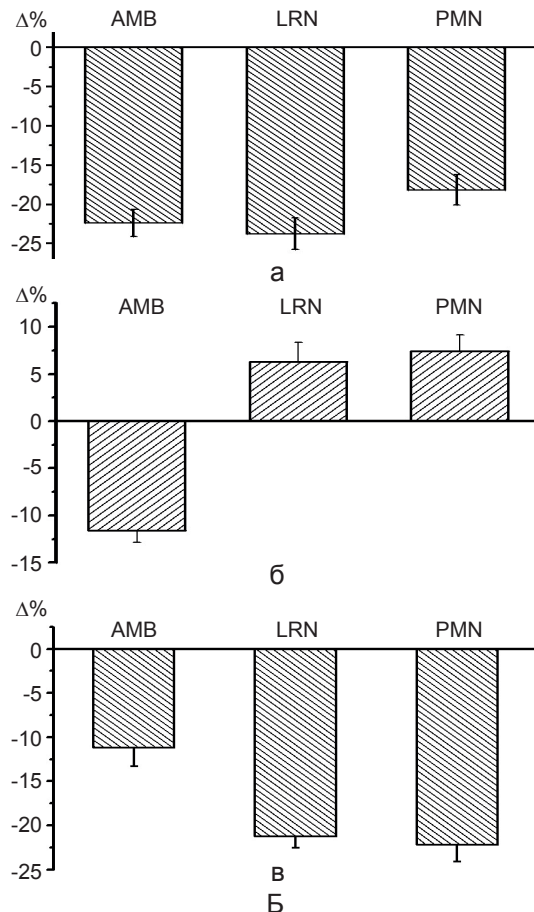
Рис.4 Ефекти ін'єкцій L-аргініну (10^{-10} моль/л) в ядра довгастого мозку щурів з експериментальним геміпаркінсонізмом у нормальному світловому режимі (А) і після тривалого цілодобового освітлення цих тварин (Б).

На А: 1- контроль, 2 - після дегенерації дофамінергічних нейронів чорної субстанції.

На Б: а - контроль (L-аргінін, 10^{-10} моль/л), б – щури з геміпаркінсонізмом після 3-тижневого освітлення (L-аргінін, 10^{-8} моль/л), в – щури з геміпаркінсонізмом після 3-тижневого освітлення (L-аргінін, 10^{-6} моль/л). AMB- обопільне ядро, n.ambiguus, LRN-латеральне ретикулярне ядро, PMN – парамедіанне ядро

і PMn призводили до зниження рівня САТ на 13,4, 11,6 і 12,8% відповідно порівняно зі зниженням цього показника на 23,8, 18,2 і 22,4 % ($P<0,05$) відповідно у контрольних тварин (рис. 4).

Таким чином, послаблення ефектів ін'єкцій L-аргініну у щурів із дегенеративними змінами ДА-нейронів SN узгоджується з результатами біохімічного дослідження про зменшення активності nNOS і, відповідно, зниження конститутивного синтезу NO через L-аргінін – cNOS-шлях на рівні довгастого мозку. В біохімічному і фізіологічному дослідженнях ми аналізували



групу тварин з максимальним ушкодженням ДА-синтезувальних нейронів чорної субстанції.

Ефекти тривалого освітлення тварин на ДА-продукуючі нейрони SN на моделі експериментального геміпаркінсонізму. Тривале (впродовж 3 тиж) цілодобове освітлення щурів із дегенеративними змінами ДА-нейронів SN супроводжувалося збільшенням кількості ушкоджених нейронів. Зокрема, 60,0% тварин відповідали на системне введення Аро інтенсивними обертальними рухами (щодо 42,6% у контролі), 5,0% (щодо 3,6% у контролі) виконували незначні обертальні рухи. При цьому зменшилася кількість неушкоджених або недостатньо ушкоджених нейронів: 35,0% (щодо 53,8% в контролі) не виявили поведінкової асиметрії в Аро-тесті. (див. рис. 1).

Вплив тривалого освітлення на медулярний кардіоваскулярний контроль у щурів з експериментальним геміпаркінсонізмом. Після тривалого цілодобового освітлення щурів спостерігається значне послаблення активності cNOS у довгастому мозку (див. рис.3, таблиця), яке призводить до пригнічення *de novo* синтезу NO. Так, активність cNOS у гомогенаті довгастого мозку знижується більше ніж вдвічі до $2,46 \pm 0,80$ пмоль / хв ($P < 0,05$) порівняно з $5,44 \pm 0,35$ пмоль / хв у контрольних щурів. Отримані результати свідчать про те, що тривале освітлення

тварин супроводжується значним зниженням синтезу NO у довгастому мозку щурів. При цьому також знижується синтез NO в тканинах і мітохондріях серця (див. таблицю), тобто порушення в системі NO відбуваються не тільки в центральних, але також у периферичних елементах системи кровообігу. При тривалому цілодобовому освітленні щурів спостерігається також поглиблення нітрозативного стресу, про що свідчить значне підвищення активності iNOS у довгастому мозку і серці (див. таблицю).

Треба також зазначити, що у фізіологічних експериментах на тваринах з геміпаркінсонізмом після тривалого освітлення ми не відмічали зрушень рівня САТ при введенні L-аргініну в концентрації 10^{-10} моль/л, а в концентрації 10^{-8} моль/л спостерігалися статистично невірогідні ($P > 0,05$) гіпотензивні реакції (PMn), або взагалі розвиток гіпертензивних реакцій (AMB і LRN) у структурах довгастого мозку, в яких експресується nNOS. Зокрема, введення L-аргініну (10^{-8} моль/л) в PMn викликало статистично невірогідні зміни рівня САТ: його зниження на 11,6 % ($P > 0,05$) або незначне підвищення в середньому на 6,3 і 7,4 % ($P > 0,05$) у AMB ($n=10$) і LRN ($n=10$). Тільки при збільшенні концентрації до 10^{-6} моль/л ін'єкції L-аргініну супроводжувалися зниженням рівня САТ у всіх трьох ядрах: у LRN, AMB і PMn на 22,2, 21,2 і 11,2 % ($P < 0,05$), тобто воно наближа-

Активність (пмоль/хв) ферментів синтезу оксиду азоту в умовах тривалого цілодобового освітлення

Схема досліджу	NO-синтаза		Аргіназа
	конститутивна	індуцибельна	
Довгастий мозок			
Контроль	5,44±0,35	1,40±0,13	1,03±0,12
Освітлення	2,46±0,80	12,13±1,01	3,76±0,42
Серце			
Контроль	6,38±1,14	1,25±0,35	1,13±0,14
Освітлення	1,09±0,43*	11,52±4,1*	2,75±0,46*
Мітохондрії серця			
Контроль	3,64±0,27	1,5±0,06	2,11±0,17
Освітлення	2,07±0,5	6,16±1,24	6,27±0,77***

* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ порівняно з контролем

лося до значень у контрольних щурів при введенні амінокислоти в концентрації 10^{-10} моль/л (рис.5).

Отже, тривале цілодобове освітлення щурів з експериментальним геміпаркінсонізмом сприяє подальшому зменшенню продукції NO в центральних (довгастий мозок) і периферичних (серце) механізмах регуляції функції кровообігу.

Слід відмітити, що в умовах тривалого цілодобового освітлення, на фоні значно зниженої активності cNOS в 4 рази підвищується активність аргінази, іншого ензиму, що використовує L-аргінін як субстрат для метаболічних перетворень на конкурентній з cNOS основі. В цьому випадку зниження активності cNOS може бути наслідком дефіциту L-аргініну для метаболічних перетворень. В умовах тривалого цілодобового освітлення у щурів з експериментальним геміпаркінсонізмом поглиблюється нітрозативний стрес (див. таблицю).

Отже, у тварин з експериментальним геміпаркінсонізмом, який розвивається внаслідок руйнування значної частини ДА нейронів SN середнього мозку, послаблюється NO-ергічний контроль функції кровообігу кардіоваскулярними нейронами довгастого мозку, а саме: знижується активність nNOS і, відповідно, de novo синтез NO, що призводить до зменшення ефектів її активації при ін'єкціях L-аргініну в медулярні ядра. Тривале цілодобове освітлення щурів впродовж 3 тиж, яке звичайно супроводжується зменшенням синтезу гормону епіфіза мелатоніну [29], поглиблює негативний вплив руйнування ДА-нейронів SN на систему кровообігу. Зокрема, тривале цілодобове освітлення послаблює ефекти активації nNOS у низці ядер довгастого мозку, зокрема в n.ambiguus, латеральному і парамедіанному ядрах. Отримані нами результати також свідчать про підвищену активність iNOS у довгастому мозку і серці щурів з експериментальним геміпаркінсонізмом, яка додатково посилюється в умовах тривалого цілодобового освітлення.

L.M. Shapoval, B.S. Kop'yak, O.V. Dmytrenko, V.O. Mayskiy, O.P. Mankivska, V.F. Sagach

NO-ERGIC CONTROL OF BLOOD CIRCULATION IN THE MEDULLA OBLONGATA OF RATS WITH EXPERIMENTAL HEMIPARKINSONISM UNDER EXPOSURE TO CONTINUOUS LIGHT

The study was conducted on rats with unilateral damage to dopaminergic (DA) neurons in substantia nigra of the midbrain (experimental hemiparkinsonism). Degeneration of dopaminergic (DA) neurons was accompanied by hyperactivity of those neurons that remained intact and responded to apomorphine (Apo) test by rotational movements. Depending on the number of rotations, three groups of animals were defined. In the medulla oblongata of rats with unilateral damage to dopaminergic (DA) neurons, a significant increase in the activity of inducible NO-synthase (iNOS) was observed, while the activity of constitutive NO-synthase (cNOS) tended to decrease compared with that in control rats. An activation of neuronal NO-synthase (nNOS) in those rats by injections of L-arginine in the medullary nuclei was accompanied by weakening of the hemodynamic effects compared to those in control rats. An exposure of animals to continuous light for three weeks was accompanied by increasing the number of damaged DA-ergic neurons in substantia nigra. At that, a significant decrease in cNOS activity in the medulla oblongata was observed, leading to the inhibition of de novo synthesis of nitric oxide (NO). The reduction of NO synthesis in the medulla oblongata neurons of rats with experimental hemiparkinsonism following their exposure to continuous light was also evidenced by the reduction of the amount of nitrite (NO_2^-) anion.

Key words: nitric oxide; medulla oblongata; substantia nigra; exposure to light.

OO.Bogomolets Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

Л.М.Шаповал, Б.С.Коп'як, О.В.Дмитренко, В.А.Майський, Е.П.Маньковская, В.Ф.Сагач

НО-ЭРГИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ ФУНКЦИИ КРОВООБРАЩЕНИЯ В ПРОДОЛГОВАТОМ МОЗГЕ КРЫС С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ ГЕМИПАРКИНСОНИЗМОМ В УСЛОВИЯХ ДЛИТЕЛЬНОГО КРУГЛОСУТОЧНОГО ОСВЕЩЕНИЯ

Исследование проведено на крысах с односторонним повреждением дофаминергических (ДА) нейронов черной субстанции (substantia nigra) среднего мозга (экспериментальный гемипаркинсонизм). Дегенерация ДА-нейронов черной субстанции сопровождалась развитием гиперактивности тех нейронов, которые остались неповрежден-

ними і реагировали на апоморфиновий (Аро) тест вращательными движениями. В зависимости от количества ротаций, выделены три группы животных. ДА-нейроны черной субстанции разрушены в этих группах на 96, 86 и 44%. В продолговатом мозгу крыс с экспериментальным гемипаркинсонизмом наблюдалось значительное повышение активности индуцибельной NO-синтазы (iNOS), а активность конститутивной NO-синтазы имела тенденцию к снижению по сравнению с такой у контрольных крыс. Эффекты инъекций L-аргинина в медуллярные ядра, вовлеченные в нервный контроль функции кровообращения, у этих крыс были менее выраженными по сравнению с контролем. Длительное круглосуточное освещение животных с экспериментальным гемипаркинсонизмом сопровождалось увеличением количества поврежденных ДА-эргичных нейронов черной субстанции и нарушением медуллярного NO-эргического контроля. В частности, значительно уменьшалась активность cNOS в продолговатом мозгу, что приводило к угнетению *de novo* синтеза оксида азота. О снижении синтеза NO нейронами продолговатого мозга в условиях недостаточного синтеза мелатонина свидетельствует также снижение пулов нитрит-аниона и низкомолекулярных нитрозотриолов, а также ослабление физиологических эффектов инъекций L-аргинина в медуллярные ядра.

Ключевые слова: оксид азота; продолговатый мозг; черная субстанция; освещение.

REFERENCES

1. Magerkurt C, Schnitzer R, Braune S. Symptoms of autonomic failure in Parkinson's disease: prevalence and impact on daily life. *Clin Auton Res*. 2005;15(2):76-82.
2. Talanov SA, Kotsuruba AV, Chorna SV, Rudyk OV, Sagach VF. Increased sensitivity of mitochondrial permeability transition causes myocardial dysfunction in rats with chronic deficiency of nigrostriatal dopamine. In: *Adv Biomed Res, Univ Cambridge*. 2010;318-22
3. Tsang AH, Chung KK. Oxidative and nitrosative stress in Parkinson's disease. *Biochem Biophys Acta*. 2009;1792(7):643-50.
4. Aquilano K, Baldelli S, Rotilio G, Ciriolo MR. Role of nitric oxide synthases in Parkinson's disease: a review on the antioxidant and anti-inflammatory activity of polyphenols. *Neurochem Res*. 2008;33(12):2416-26.
5. Shapoval LN, Sagach VF, Pobegailo LS. Nitric oxide influences ventrolateral medullary mechanisms of vasomotor control in the cat. *Neurosci Lett*. 1991;132:47-50.
6. Krukoff TI. Central actions of nitric oxide in regulation of autonomic functions. *Brain Res*. 1999;30:52-65.
7. Zanzinger J. Role of nitric oxide in the neural control of cardiovascular functions. *Cardiovascul Res*. 1999; 43:839-649.
8. Shapoval LN. Nitric oxide and nervous control of cardiovascular function. In: *Receptors, Channels and Messengers*. Kostyuk PG, Lukyanetz EA eds., DUS Kiev. 2005; p.318-37.
9. Phattananarudee A, Towiwat P, Maher TJ, et al. Effects of medullary administration of a nitric oxide precursor on cardiovascular responses and neurotransmission during static exercise following ischemic stroke. *Canad J Physiol Pharmacol*. 2013;91(7):510-20.
10. Zanzinger J, Seller H. Species differences in the distribution of nitric oxide synthase in brain stem regions that regulate sympathetic activity. *Brain Res*. 1997;764:265-68.
11. Lin LH, Taktakishvili O, TALMAN WT. Identification and localization of cell types that express endothelial and neuronal nitric oxide synthase in the rat nucleus tractus solitarii. *Brain Res*. 2007; 1171:42-51.
12. Aydogan SM, Yerer AB, Goktas Melatonin and nitric oxide J. *Endocrinol Invest*. 2006;29(3):281-87.
13. Reiter RJ. Melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocrinol Rev*. 1991; 12:151-80.
14. Doringuez-Rodriguez A, Abreu-Gonzalez P, Sanchez JJ. Melatonin and circadian biology in human cardiovascular disease. *J Pineal Res*. 2010; 49:14-22.
15. Pechanova O., Paulis L., Simko F. Peripheral and central effects OF melatonin on blood pressure regulation. *Int J Mol Sci*. 2014;15:17920-937.
16. Paulis L, Simko F. Blood pressure modulation and cardiovascular protection by melatonin: potential mechanisms behind. *Physiol Res*. 2007;56:671-84.
17. Vazan R, Beder I, Styk J. Melatonin and the heart. *Cesk Fysiol*. 2004;53:29-33
18. Doolen S, Krause DN, Dubocovich ML, et al. Melatonin mediates two distinct responses in vascular smooth muscle. *Eur J Pharmacol*. 1998;345:67-69.
19. Dobsak P, Siegelova I, Eicher JC et al. Melatonin protects against ischemia-reperfusion injury and inhibits apoptosis in isolated working rat heart. *Pathophysiology*. 2003;9:179-87.
20. Sagach VF, Rudyk OV, Vavilova GL, Kotsiuruba AV, Tkachenko JuP. Melatonin recovers ischemic tolerance and decreases the sensitivity of mitochondrial permeability transition pore opening in the heart of aging rats. *Fiziol Zh*. 2006;52(3):3-14 [Ukrainian].
21. Ungerstedt U. 6-hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. *Eur J Pharmacol*. 1968;5:107-10.
22. Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Acad Pres New York, 1982;
23. Ungerstedt U. Postsynaptic supersensitivity after 6-hydroxydopamine induced degeneration of nigrostriatal dopamine system. *Acta Physiol Scand*. 1971;82:69-93.
24. Agid Y, Javoy F, Glowinski G. Hyperactivity of remaining dopaminergic neurons after partial destruction of the nigro-striatal dopaminergic system in the rat. *Nat New Boil*. 1973;245:150-51.
25. Salter M, Knowles RG, Moncada S. Widespread tissue distribution, species and changes in activity of Ca²⁺-dependent and Ca²⁺-independent nitric oxide syntases.

- FEBS Lett. 1991;291:145-49.
26. Chin SY, Pandey KN, Shi SJ, et al. Increased activity and expression of Ca^{2+} -dependent NOS in renal cortex of ANG II-infused hypertensive rats. Amer J Physiol. 1999;277:797-804.
27. Durante W, Johnson F.K., Johnson A.J. Arginase: a critical regulator of nitric oxide synthesis and vascular function. Clin Exp Pharmacol. Physiol. 2007;34(9):906-11.
28. Boyde J.R, Rahmotullah M. Optimization of conditions for the colorimetric determination of citrulline, using diacetyl monoxime. Anal Biochem. 1980;107:424-31.
29. Lewy AJ, Wehr TA, Goodwin FK, Newsome DA, Market SP. Light suppresses melatonin secretion in humans. Science, 1980, 210 (4475), 1267-69

*Матеріал надійшов до
редакції 11.07.2016*