



THE EXISTENCE OF CHOLINERGIC INNERVATION AND FUNCTION
IN BOVINE PINEAL GLAND

PANSIRI PHANSUWAN
๕

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILMENT OF
THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF
DOCTOR OF PHILOSOPHY
(ANATOMY)

IN
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY

1990

อธิบดีมหาวิทยาลัย

๑๓

มีหน้าที่อภิบาล ม. มณีต

ชื่อวิทยานิพนธ์ เส้นประสาทชนิดโคลิเนอร์จิกที่มาจากคอมพิวเตอร์และทำหน้าที่ใน
ต่อมไพเนียลของวัว

ผู้วิจัย ปานสิริ พันธุ์สุวรรณ

ปริญญา ปรัชญาคุณภิวัฒน์ (ภาชวึกาศาสตร์)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

ปิยะรัตน์ กลางกัลยา Ph.D.

บุญเสริม วิทยชานาญกุล M.D., Ph.D.

เรือน สมณะ M.D., Ph.D.

วันที่สำเร็จการศึกษา 12 พฤศจิกายน พ.ศ. 2533

บทคัดย่อ

เส้นประสาทชนิดโคลิเนอร์จิกมาจากคอมพิวเตอร์และทำหน้าที่ในต่อมไพเนียลของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมนั้นมีหลักฐานทั้งสนับสนุนและคัดค้านกัน ปัญหาที่ยังเป็นที่ถกเถียงกันอยู่ ดังนั้นในการศึกษาดังนี้ได้ทำการทดลอง 5 หัวข้อเพื่อที่จะพิสูจน์ว่ามีเส้นประสาทชนิดนี้มาจากคอมพิวเตอร์ไพเนียลของวัว

เอนไซม์ choline acetyltransferase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่สังเคราะห์สารสื่อประสาทชนิด acetylcholine พบว่ามี activity และศึกษาถึงคุณสมบัติด้านจลนศาสตร์โดยวิธีหัวเคมี พบว่าในต่อมไพเนียลวัวเอนไซม์นี้มีค่า specific activity เท่ากับ 0.0339 ± 0.0042 nmol/min/mg protein และมีค่า $K_m = 124.86 \pm 24.06$ uM และ 3.11 ± 0.94 mM สำหรับ acetyl CoA และ choline ตามลำดับ รวมทั้งมีค่า $V_{max} = 0.0598 \pm 0.0034$ nmol/min/mg protein และ 0.0155 ± 0.0060 nmol/min/mg protein สำหรับ acetylCoA และ choline ตามลำดับ

จากการศึกษาดัวยเทคนิค immunohistochemistry โดยใช้ antibody ต่อเอนไซม์ choline acetyltransferase (ChAT) ทั้งชนิด monoclonal และ polyclonal และใช้วิธี avidin-biotin complex พบว่ามี เส้นประสาทและเซลล์ประสาทที่แสดงปฏิกิริยาต่อ ChAT ภายใต้ออมไพเนียลวัว โดยเส้นประสาทเหล่านี้กระจายอยู่ทั่วไปในต่อมทั้งที่รอบๆเส้นเลือด และระหว่างเซลล์ pinealocyte และยังพบเส้นประสาทเหล่านี้ที่ rostral และ caudal pineal stalk ซึ่งยื่นต่อเข้าไปในต่อม และนอกจากนี้ยังพบว่าที่ปลายสุดของต่อมมีเส้นประสาทเหล่านี้แทงทะลุเข้ามายังต่อมด้วย

การศึกษาคุณลักษณะของตัวต่อรับ (receptor) ชนิด muscarinic cholinergic ในต่อมไพเนลลิว โดยใช้สาร [^3H]-(-)-quinuclidinyl benzilate (QNB) เป็น radioligand พบว่าที่ 25°C การจับระหว่างตัวต่อรับกับสารนี้จะเข้าสู่สมดุล (equilibrium) ภายใน 60 นาที และคงที่อยู่ เช่นนี้มากกว่า 2 ชั่วโมง การจับนี้เป็นปฏิกิริยาอ้อมตัว และ ทวนกลับ และจะมากขึ้น ถ้าเพิ่มปริมาณของเนื้อเยื่อ การศึกษาผลของการอ้อมตัวพบว่า การจับกันเป็นแบบ 1 binding site ซึ่งมีค่าคงที่สมดุลของการแยก (K_D) = 0.0423 ± 0.1 nM และมีค่าความหนาแน่นสูงสุดของตัวต่อรับ (B_{max}) = 69.75 ± 20.91 fmol/mg protein และจากการหาความเข้มข้นของสารที่ยับยั้งการจับนี้ 50% (IC_{50}) พบว่าสารเหล่านี้มีความสามารถของการยับยั้งตามลำดับดังนี้คือ dextetimide > (+)QNB > scopolamine > atropine > pilocarpine > oxotremorine > levetimide > acetylcholine > carbachol

และจากการศึกษาโดยเทคนิค in vitro autoradiographic receptor binding โดยใช้ [^3H]-(-)-QNB เป็น ligand พบว่าตัวต่อรับชนิด muscarinic กระจายอยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์ของ pinealocytes และเซลล์ประสาทภายในต่อมไพเนลลิว (intrapineal neurons)

นอกจากนี้ได้ทำการทดลองหน้าที่ของระบบประสาทชนิด cholinergic ที่มีต่อต่อมไพเนลลิว โดยดูถึงผลของสารที่เป็น muscarinic agonists ต่อ activity ของเอนไซม์ serotonin N-acetyltransferase (SNAT) ในชั้นเนื้อของต่อมไพเนลลิวที่เลี้ยงในน้ำยาเพาะเลี้ยง เอนไซม์นี้ทำหน้าที่ควบคุมการสร้าง melatonin พบว่าสาร agonists ได้แก่ methacholine, pilocarpine, oxotremorine และ carbachol สามารถยับยั้ง SNAT activity ได้อย่าง มีนัยสำคัญ และการยับยั้งนี้เป็นแบบขึ้นกับความเข้มข้นของสาร และยังพบว่าการยับยั้งนี้สิ้นสุดลงได้โดยใช้สารที่เป็น antagonists ซึ่งได้แก่ atropine sulfate และ (+)QNB

จากหลักฐานการศึกษาทั้งทางด้านเภสัชวิทยาและกายวิภาคศาสตร์ในครั้ง นี้ สรุปได้ว่า สันนิษฐานการมีเส้นประสาทชนิดโคลิเนอร์จิกมาควบคุมต่อมไพเนลลิว โดย cholinergic agonists สามารถยับยั้ง SNAT activity ได้ ซึ่งให้เห็นถึงหน้าที่ของเส้นประสาทชนิดนี้ที่มีต่อต่อมไพเนลลิว

Thesis title The existence of cholinergic innervation and function in bovine pineal gland

Name Pansiri Phansuwan

Degree Doctor of Philosophy (Anatomy)

Thesis Supervisory Committee :

 Piyarat Klangkalya, Ph.D.

 Boonsirm Withyachumnarnkul, M.D., Ph.D.

 Reon Somana, M.D., Ph.D.

Date of Graduation : 12 November B.E. 2533 (1990)

ABSTRACT

Evidence in supporting the presence as well as the absence of the cholinergic innervation of mammalian pineal glands have presented. However, it is still controversial. In the present study, five lines of experiments were investigated to prove the criteria of innervation and functions of cholinergic system on the bovine pineal gland.

The biochemical assay of choline acetyltransferase (ChAT), enzyme for acetylcholine synthesis, was performed including its kinetic study. The ChAT of bovine pineal gland had the specific activity of 0.0339 ± 0.0042 nmol/min/mg protein with the Michealis-Menten constant (K_m) values of 124.86 ± 24.06 μ M and 3.11 ± 0.94 mM with respect to acetyl CoA and choline,

respectively and with the maximum initial velocity (V_{max}) values of 0.0598 ± 0.0034 nmol/min/mg protein and 0.0155 ± 0.0060 nmol/min/mg protein with respect to acetyl CoA and choline, respectively.

By immunohistochemical localization technique using both monoclonal and polyclonal antibodies against choline acetyltransferase (ChAT) with avidin-biotin complex method, the ChAT-immunoreactive (IR) nerve fibers were located throughout the pineal gland, both in the perivascular spaces and between the pinealocytes. In addition, some ChAT-IR intrapineal neurons were found. Within the rostral and caudal pineal stalk, ChAT-IR nerve fibers were demonstrated and could be followed into the gland. At the caudal tip of the pineal gland, a bundle of ChAT-IR nerve fibers was observed to penetrate into the gland together with blood vessels.

The muscarinic cholinergic receptors sites have been identified and characterized in bovine pineal gland by using [3 H](-)-quinuclidinyl benzolate (QNB) as a radioligand. At 25 C, the binding reached equilibrium within 60 min and remained constant for an addition two hours. Furthermore, the binding was saturable, reversible and tissue dependent in nature. The saturation experiment of muscarinic receptor sites

revealed a single binding site with a dissociation equilibrium constant (K_D) of 0.423 ± 0.01 nM and a receptor density (B_{max}) of 69.75 ± 20.91 fmol/mg protein. Then, the concentration of the drugs required to inhibit 50% of the binding (IC_{50}) were determined having the descending order of potency in competing with ligand binding to be dexetimide > (+)QNB > scopolamine > atropine > pilocarpine > oxotremorine > levetimide > acetylcholine > carbachol.

By in vitro autoradiographic receptor binding technique, using the [3 H](-)QNB as a ligand, the localization of muscarinic receptor sites were demonstrated on the membrane of both pinealocytes and intrapineal neurons.

Moreover, in order to indicate the function of the cholinergic system on the pineal gland, the effect of muscarinic agonists on the serotonin N-acetyltransferase (SNAT), a rate limiting enzyme of melatonin synthesis, activity was examined in the bovine pineal explant in culture. The muscarinic agonists, i.e. methacholine, pilocarpine, oxotremorine and carbachol significantly inhibit the SNAT activity. The inhibition was in dose-dependent fashion. In addition, the inhibitory effect of agonists was blocked by cholinergic antagonists, i.e. atropine sulfate and (+)QNB.

In conclusion, the pharmacological and anatomical evidences presented in this study strongly support the cholinergic innervation of the bovine pineal gland. In addition, by the inhibitory control of the cholinergic agonists on the SNAT activity indicates a functional influence of a cholinergic nervous system on the pineal gland.

