МИНОБРНАУКИ РОССИИ

Федеральное государственное общеобразовательное учреждение высшего профессионального образования

Брянский государственный университет имени академика И.Г. Петровского

Естественно-географический факультет

Кафедра зоологии и анатомии

КУРСОВАЯ РАБОТА

Физиологическая функция каудальной нейросекреторной системы (КНСС)

Выполнила студентка 4 к., 3 гр.

Батынкова Ю.Ю.

Проверил: А.П. Бахтинов,

к.м.н., профессор

Брянск - 2014

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ

Глава 1. Литературный обзор

.1 Структура КНСС

.2 Биохимическая и иммунологическая характеристика гормонов КНСС рыб

.3 Биохимическая и иммунологическая характеристика короткого пептида КНСС человека и других позвоночных

Глава 2. Определение основных биологических показателей короткого пептида КНСС человека

.1 Изучение биологической активности короткого пептида КНСС человека

.2 Определение единицы активности короткого пептида КНСС человека

.3 Биологический метод исследования короткого пептида КНСС человека

Глава 3. Влияние короткого пептида КНСС человека на системы органов

.1 Влияние короткого пептида КНСС на половую и репродуктивную систему крыс

.2 Влияние короткого пептида КНСС человека на сердечно-сосудистую систему лягушки и электрокардиограмму крыс

.3 Влияние короткого пептида КНСС человека на системное артериальное давление на примере котов и кроликов

.4 Влияние короткого пептида КНСС человека в регуляции иммунитета и стресса

.5 Влияние короткого пептида КНСС человека на работоспособность мышц

Глава 4. Этологическое исследование «Наблюдение поведенческих реакций самок мышей»

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

ВЫВОДЫ

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования: Данное исследование позволяет изучить основное значение КНСС и ее гормонов, антисыворотки UII.

Каудальная нейросекреторная система (КНСС) описана у костистой рыбы Auguila Japonica японским ученым Enami в 1955 году. У нее КНСС рсполагается в хвостовом отделе спинного мозга и состоит из нейросекреторных клеток, расположенных преимущественно в передних его рогах. Они синтезируют нейросекрет, который по аксонам нейросекреторных клеток (НСК) транспортируется в вентральное выпячивание мозга, образованное глиоцитами, названное урофизом, который рассматривается как депо нейросекрета. [3]

Со времени открытия каудальной нейросекреции Enami до 1999 года зарубежные ученые считали, что КНСС присуща исключительно рыбам. Даже работы Ganguli (1961), убедительно доказывающих наличие этой системы у амфибий - у одного из представителей позвоночных, что было воспринято критически и не воспринималось всерьез. Все мировой сообщество ученых по - прежнему исследовало каудальную нейросекрецию только у рыб, в том числе отечественные ученые Паленов А.Л., Саенко И.И.[3]

Определенную роль в доказательстве наличия КНСС у других представителей животного мира имеют работы отечественных ученых К.А. Мещерская, А.П. Бахтинов., В.С. Бахтинова в 1977 когда был выделен короткий пептид из пояснично - крестцового отдела спинного мозга человека, доказан его контрацептивный эффект и получена специфическая сыворотка на кролике. В 1999 году способ выделения и очистки был подвержден авторским свидетельством СССР.

КНСС имеет ряд гормонов, а именно уротензин I,II,III,IV. Среди вышеперечисленных наиболее активный уротензин II. Он имеет специфический рецептор - UT в скелетной и гладкой мускулатуре, в гладкомышечных клетках в кардиомицетах, эндотелиоцитах и субэндотелии, в нейронах Центральной нервной системы и глиоцитах, в частности, в астроцитах, поэтому его биологическое действие многостороннее, в том числе, на функцию ВНД.

По своей биологической активности уротензины относят к древним регуляторным пептидам (И.П. Ашмарин, О.А. Гомазков, 1999 и другие). Это низко - и высокомолекулярные соединения, представляющие собой цепочку аминокислотных остатков, которые соединены между собой пептидной связью. Человеческий уротензин II, состоит из 11 аминокислот. При этом пептидные цепи спонтанно укладываются в сложные трехмерные структуры, что характерно для всех белков.

Биологические эффекты уротензина II человека осуществляются путем связи со специфическими рецепторами GPR-14 SENR или UT. Этот рецептор обнаружен в ряде клеток, тканей, органов животных и человека. Эта система несомненно играет ключевую роль в развитиии и регуляции вазомоторного, секреторного, сенсорного и других процессов.

Цель исследования: выявить основные физиологические функции каудальной нейросекреторной системы у животных и человека.

Задачи исследования:

. Рассмотреть влияние на поведенческие показатели животных.

2. Овладеть основными методиками исследования данной проблемы, овладеть навыками проведения эксперимента.

. Научиться обрабатывать полученные данные.

Глава 1. Биологическая, биохимическая, иммунологическая характеристика гормонов каудальной нейросекреторной системы

1.1 Биохимическая и иммунологическая характеристика гормонов КНСС

Структура и феномен нейросекреции КНСС, описанные Enami у костной рыбы, явились началом активного изучения различных аспектов этой нейросекреторной системы у обоих классов и всех подклассов пресноводных и морских рыб. Особое внимание зарубежными учеными уделялось биохимическим, иммунологическим и другим исследованиям пептидов, выделяемых из урофиза и хвостовой части спинного мозга представителей позвоночных животных.

В 1990 году Conlon с соавторами, исследуя спинной мозг камбалы, получили из ее урофиза два гомогенно очищенных пептида примерно одинаковой концентрации, состоящих из 41 и 65 аминокислотных остатков. Эти факты позволили им высказать мнение, что второй пептид является проуротензином. Дальнейшее исследование ряда зарубежных ученых выделили из мозга речной миноги, собачьей акулы, ската и костно - хрящевых рыб. Данные ученые считают, что U II у ранних позвоночных мог функционировать в ЦНС, скорее всего, как нейротрансмиттер, чем как нейрогормон. В 1999 году Couloam, изучая топографию м-РНК и про - U II в ряде органов, провели анализ и показал, что он имеет циклическую часть, структура которой сохраняется от миноги до человека. Сохранение этой части эволюционно древнего пептида каудальной нейросекреторной системы у низко и высокоорганизованных позвоночных свидетельствует о биологически важной его значимости для всех представителей этого вида животного мира.

1.2 Биохимическая и иммунологическая характеристика короткого пептида КНСС человека и других позвоночных

В отличие от зарубежного сообщества ученых, занимающихся исследованием КНСС исключительно у рыб, владивостокские ученые независимо от них гораздо раньше открыли КНСС у человека, млекопитающих, птиц, амфибий и других позвоночных животных при попутных исследованиях постнатального гистогенеза эпендимы человека, когда был открыт интраспинальный орган человека (ИОЧ).[3]

Его открытие в процессе изучения этой проблемы, наличие в нем обильной васкуляризации и иннервации, а также активных оксидоредуктах, фосфатаз и секреторных включений П.А. Мотавкин, А.П. Бахтинов связывали с эндокринной функцией пояснично - крестцового отдела спинного мозга человека в пределах от II поясничного до II-III крестцовых сегментов, где формируется ИОЧ - пептидный препарат, обладающий гипертензивным, иммуногенным и кардиотоническим эффектом. Иммуногенные свойства позволили получить специфическую сыворотку на кролике против данного пептида.

В качестве сырья для получения короткого пептида КНСС использовался пояснично - крестцовый отдел спинного мозга трупов обоего пола здоровых людей в возрасте 30-45 лет, погибших в железнодорожных или автомобильных катастрофах, а также результаты убийств и самоубийств. Мозг брался в зимний период обычным путем спустя 2-6 часов после констатации смерти сотрудниками Приморской краевой и Брянской судебно-медицинской экспертизы. Каждый образец мозга помещался в чашку Петри и хранился в морозильной камере холодильника при температуре -180С до момента выделения из него препарата, который затем использовался для биохимических, фармакологических и экспериментально - биологических исследований.

1.3 Биохимический способ получения и очистки короткого пептида человека и млекопитающих

Короткий пептид КНСС человека и млекопитающих мы получали по оригинальной методике А.П. Бахтинова и соавторов (А.с. СССР №689015). Несмотря на то, что этот способ лабор<1торного выделения гомогенного препарата весьма прост, им получают вполне чистый гомогенный препарат, что было доказано B.C. Бахтино-вой (1986) на основании диск-электрофореза по Мауреру (1963) на 7%-ном полиакриламидном геле и тонкослойной хроматографией на геле в ТИБОХ АН СССР (Владивосток). В настоящее время А.П. Бахтиновым и А.А. Бахтиновым разработан более совершенный метод получения пептидов КНСС (патент РФ на изобретение № 2224528, опубл. в БИ №6 от 27.02.2004). Он требует более сложной аппаратуры и реактивов.

Однако полученные новым и предыдущим способом пептиды КНСС проявляют абсолютно одинаковую специфическую для них биологическую активность, выделенные от ряда животных (крыс, мышей, быков, свиней, котов, кроликов, собак, лягушек и кур), независимо от метода выделения (B.C. Бахтинова, 1986; А.П. Бахтинов, И.Ю. Адамович, 1999; 2000; С.А. Лушкина, 20002; С.А. Лушкина, А.П. Бахтинов, 2002; С.А. Лушкина, О.Е. Изотова, 2002). Поэтому мы ограничились получением пептида первым лабораторным способом - более простым и доступным.[14]

Для этого замороженный спинной мозг животных или человека освобождают от твердой и мягкой мозговых оболочек, гомогенези-руют в дистиллированной воде, содержащей 0,05 М ЭДТА в соотношении 1:5. Полученный водный гомогенат ткани спинного мозга смешивают с хлороформом в соотношении 1:1 и сохраняют в холодильной камере при температуре +5 - 8°С, в течение 1-го часа периодически встряхивают смесь для полной денатурации высокомолекулярных белков и лучшей экстракции пептида. Затем, при помощи лабораторной центрифуги ЦДН-2 при 8000±10% об/мин в течение 30 минут отделяют хлороформенную фракцию, а денатурированный белок и воду отбрасывают. Хлороформенный экстракт с помощью вентилятора высушивают в чашке Петри при температуре 15-18 градусов. Сухой хлороформенный экстракт гомогенезируют дистилированной водой. Полученную смесь осаждаюь сульфатом аммония.

Все проведенные биохимические исследования свидетельсьвуют в пользу выделения нами короткого пептида, который на основе многочисленных экспериментов был идентифицирован как уротензин II (А.П. Бахтинов, 2005), названной вначале нами вазото-нином человеческим (Vasotoninum hominis) - V-H на основании первичных его биологических эффектов (К.А. Мещерская, А.П. Бахтинов, B.C. Бахтинова, 1977).[5]

Глава 2. Определение основных биологических показателей короткого пептида КНСС человека

.1 Изучение биологической активности короткого пептида КНСС человека

Первоначально биологическая активность выделенного гомогенного пептида испытана на кровеносных сосудах брыжейки лягушки. При этом артериальные сосуды значительно повышали свой тонус, уменьшаясь в диаметре в 2-3 раза. В связи с этим препарат назван вазотонином человеческим (Vasotoninum hominis) - V-H.

.2 Определение единицы активности короткого пептида КНСС человека

Вначале она была определена на перфузионном сердце лягушки. За единицу активности принята такая концентрация препарата в растворе, которая вызывает увеличение частоты сердечных сокращений на 10±2,7% от исходной. Определенная методом Лоури (Lowry, 1951), эта концентрация составила 0,5 мкг/мл протеина (V-Н). Это так называемая лягушачья доза (ЛД). При определении свойств препарата в остром опыте на кроликах массой 2,8-3,0 кг за единицу активности принималось количество препарата, которое вызывало у них повышение систольного артериального давления на 10±1,5% от исходного, что составляло 4 мкг/кг протеина по Лоури.

Исследование влияния единицы активности короткого пептида КНСС человека на органы-мишени половых гормонов

За единицу активности принималось количество препарата, которое вызывало снижение массы матки половозрелых крыс в фазе межтечки в 1,5 раза по сравнению с контролем после введения определенного титра раствора данного препарата. Эксперимент длился 6 дней. Было доказано, что доза, вызывающая такое действие на матку крыс, соответствует 25 мкг/кг протеина, определяемого методом Лоури.

При проведении дальнейших исследований на млекопитающих за терапевтическую (рабочую) дозу V-H принималась масса короткого пептида КНСС человека, равная 25 мкг/кг. Эта экспериментально обоснованная доза (25 мкг/кг) постоянно применялась в работе с гомойотерными животными.

Антиэстрогенный и антиандрогенный эффекты V-H были проверены нами на крысах обоего пола (К.А. Мещерская, А.П. Бахтинов, B.C. Бахтинова, 1977), когда учитывалось снижение массы матки у самок и уменьшение массы простаты у самцов крыс и контрацептивный эффект, наблюдаемый у особей обоего пола после соответствующего эксперимента, а также вазоактивный эффект; который и послужил причиной названия данного пептида вазотонином человеческим (Vasotoninum hominis) - V-H.

Острая и хроническая токсичность активного пептида, его влияние на гемодинамические показатели в остром и хроническом опытах, влияние на электрокардиограмму, вазотонический эффект в опыте по методу Кравкова-Соловейчика на изолированных ушах кролика, исследование сократительной способности вен, влияние V-H на массу органов растущих крыс, более точное определение его контрацептивного эффекта, наблюдение за развитием и размножением у крыс 2 и 3 поколений после контрацептивного эффекта, влияние исследуемого препарата на массу органов у кастрированных крыс обоего пола, морфологические методы исследования органов при влиянии V-H на самцов и самок крыс, влияние V-H на развитие эмбрионов птиц и выклев головастиков из икры лягушки при действии пептида на их оплодотворенную икру, регуляцию функции меланоцитов кожи лягушек, действие их на макрофаги печени взрослых крыс при хроническом опыте и другие опыты будут рассмотрены отдельно.

2.3 Биологический метод исследования короткого пептида КНСС человека

Известно, что биологическая активность и концентрация гормонов прямо пропорциональны его количеству (Бакл Дж., 1986). Биологическую активность короткого пептида КНСС человека определяют перед проведением каждой серии опытов не менее чем на двух обездвиженных и вскрытых взрослых самцах лягушек, коих фиксируют к пробкой пластинке я положении на спине. Их сердце обнажают, вскрыв эпикард, и подсчитывают исходную частоту сердечных сокращений (ЧСС). Затем на сердце каждой лягушки наносят по одной капле коротко пептида КНСС человека, титруемого в 0,9%-ном растворе хлорида натрия, начиная с титра раствора 1:16. При этом титр пептида КНСС человека постепенно уменьшают (1\8; 1 \* 4j I 1 2), предварительно отмыв сердце 0,9%-ным раствором хлорида натрия, отмечая каждый раз возрастание ЧСС в течение 1 минуты и сравнивая с исходным количеством сердцебиении у каждой из лягушек. Титр пептида КПСС человека, которому соответствует увеличение числа ЧСС на 10,0±2,7% от исходного, по данным B.C. Бахтиновой (1986), соответствует концентрации пептида КПСС человека, равной 0,5 мкг/мл белка, что было доказано ею по методу Lowry (1951).[6]

Лиофильно высушенный препарат в укупоренной таре, например. в запаянной ампуле, хорошо сохраняется в холодильнике при ~5-8°С в течение 12-36 месяцев. В растворе с добавление 0,02% мертиолата натрия в укупоренной посуде в холодильнике при 5-8°С он не теряет своей активности до 4-6 месяцев. В парах тимола без консервантов раствор препарата в холодильнике при 5-8°С также сохраняет активность до 1,5-2 месяцев.

Научные факты, полученные зарубежными учеными (Onstott D. и Elde R.) при иммунофлуоресцентных методах определения U II отметили, что наряду со специфическим свечением в ряде нефроцитов. свидетельствующем о наличии в них UII, определялись профили темных нейронов, что могло указывать на секрецию ими другого гормона - уротензина I.

Наши подобные исследования, проведенные в 1978 году на сре-зах спинного мозга человека, быка, кролика, крыс методом непрямой флуоресценции со специфической кроличьей сывороткой против UII (V-H), свидетельствовали о специфическом свечении в части мотонейронов, соседствующих с абсолютно темными нейронами. Наряду с этим, специфическое свечение имелось в наших препаратах по ходу кровеносных сосудов и внутри них, что свидетельствовало двух фактах: Не все мотонейроны секретируют короткий пептид. Данный пептид транспортируется по кровеносным сосудам.

Глава 3. Влияние короткого пептида КНСС человека на системы органов

.1 Влияние короткого пептида КНСС на половую и репродуктивную систему крыс

Гистологические исследования и изучение массы внутренних половых органов крыс, участвующих при исследовании хронической токсичности короткого пептида КНСС человека свидетельствуют о значительных структурных их изменениях и снижении массы по сравнению с контрольными животными. [3]

Матка экспериментальных крыс по массе в сравнении с контролем уменьшена на 37,0±2,1% (р < 0,002), а яичники - на 23,0±1,7% (р < 0,001). Микроскопические исследования этих органов также показывают их отличие от контроля. Диаметр матки уменьшен на 28,75% за счет снижения толщины миометрия (миометрий тоньше на 34,57% в сравнении с контролем) и эндометрия (эндометрий у этих самок тоньше на 22,5%). В эндометрии экспериментальных самок диаметр маточных желез на 28,73% меньше, чем у контрольных. Значительно уменьшены ветвления желез эндометрия. Выстлан он кубическим эпителием. Секрет в железах отсутствует. В яичнике экспериментальных крыс имеется масса незрелых растущих фолликулов, определяемых в два раза больше, по сравнению с контролем, масса атретических и белых тел. Желтые тела находятся на стадии пролиферации и васкуляризации. Зрелых фолликулов и желтых тел не имеется. Примордиальных фолликулов в яичнике экспериментальных самок в 2,6 раза больше, чем у контрольных. У экспериментальных самцов масса предстательной железы Уменьшена в 1,35 раза, диаметр ветвления ее желез заметно снижен. Уменьшен диаметр ядер секреторного эпителия.

Таблица 1

Морфологические изменения во внутренних половых органах самок крыс при введении вазотонина-Н в дозе 25 мкг/кг ежедневно в течение 40 дней на примере матки

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Группа животных | Внешний диаметр, мкм | Толщина миометрия, мкм | Толщина эндометрия, мкм | Диаметр маточных желез, мкм |
| Контроль | 788,6 | 118,60 | 181,5 | 29,9 |
| Эксперимент | 561,9 | 77,6 | 140,2 | 21,4 |

Таким образом, короткий пептид КНСС вызывает у экспериментальных крыс задержку развития гонад и созревания гоноцитов, а также признаки нарушения гормональной функции яичников и семенников. Это является причиной не только задержки открытия половой щели у самок, но также отставание соматического развития, заключающееся в заметном снижении массы экспериментальных самок и самцов по сравнению с контролем.

В связи со значительными изменениями в структуре гонад экспериментальных крыс, проведен эксперимент по выявлению у них возможности оплодотворения и репродуктивной функции, времени наступления беременности и плодовитости самок. Для этого были сформированы 4 группы животных по соответствующим клеткам:

- 1 самец и 5 самок, получавшие препарат в дозе 25мкг/кг в течение 40 дн.

- 1 самец, участвующий в эксперименте и 5 самок, не получавший короткий пептид КНСС человека[3]

3 - 1 самец, не получавший и 5 самок, получавших препарат в дозе 25 мкг/кг

- 1 самец и 5 самок, не получавших данный препарат.

За животными велись активные наблюдения, отмечено, что в течение 4,5 месяцев не беременели и не приносили потомства группы, находящиеся в клетках 1, 2, 3. Контрольный вариант за данный период времени дал 2 потомства. Еще через 4,5 месяца экспериментальные самки стали приносить нормально здоровое потомства, но количество крысят у них было в 2-3 раза меньше, чем у контроля. У крыс 2-3 поколения не было никаких уродств, и по срокам развития и плодоношения они не отличались.

Таблица 2

Влияние вазотонина Н на сроки первых родов и плодовитость белых крыс

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Группы животных | Количество матерей | Срок наступления первых родов | Кол-во крысят на самку |
| Интактные самки и самцы | 10 | 126 | 9 |
| Экспериментальные самцы и самки | 10 | 195 | 3 |
| Экспериментальные самцы и интактные самки | 10 | 193 | 4 |
| Экспериментальные самки и интактные самцы | 10 | 194 | 3 |

Таблица 3

Сроки наступления родов и плодовитость 2-го и 3-го поколения крыс, родившихся от экспериментальных животных

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Группы животных | Количество матерей | Сроки наступления первых родов | Количество крысят на одну самку |
| Интактные самцы и самки | 6 | 126 | 9 |
| Самцы 2-го поколения и интактные самки | 6 | 124 | 8 |
| Самки 2-го поколения и интактные самцы | 6 | 123 | 9 |
| Самцы 3-го поколения и интактные самки | 6 | 127 | 8 |
| Самки 3-го поколения и интактные самцы | 6 | 126 | 9 |

Таким образом, следует отметить, что короткий пептид КНСС вызывает длительный, но обратимый контрацептивный эффект у крыс обоего пола. При этом пептид не обладает тератогенными свойством, не вызывает эмбриологических и генетических нарушений.

.2 Влияние короткого пептида КНСС человека на сердечно-сосудистую систему

Наиболее простой экспериментальной моделью для исследования кардиотонического эффекта является сердце лягушки. Исследование проводилось по М.П. Березину. Давление перфузионной жидкости при этом устанавливается на уровне 15 см водяного столба. Канюля вводится в заднюю полую вену. Исследуемый пептид разных доз растворяется в 0,9% растворе хлорида натрия, вводится в резиновую манжету, соединенную с манжетой. Анализ, полученных эффектов свидетельствует, что по мере увеличения дозы препарата в перфузате частота и амплитуда сокращения сердца заметно возрастают, уменьшается латентный период и увеличивается продолжительность кардиотонических эффектов. Пептид оказывает на сердце лягушки положительное хроно- и инотропное действие. Сопоставление степени увеличения частоты сердечных сокращений в 1 минуту и нарастание амплитуды его сокращений свидетельствует, что при дозе 8 мкг/ мл препарата выражен в два раза больше, чем частота его сокращений. Иначе говоря, короткий пептид оказывает выраженный кардиотонический эффект, являющийся в эффективной работе сердца в систоле и достаточном времени отдыха в диастоле.

Влияние короткого пептида КНСС человека на электрокардиограмму крыс при однократном его введении в дозе 25 мкг/кг

Для выявления влияния изучаемого короткого пептида исследование проводилось на 14 белых крысах (6 самцов и 8 самок). Перфузат вводился в брюшную вену. Запись ЭКГ проводилась на двухканальном чернильно - пишущем электрокардиографе. Данные эксперимента свидетельствуют, что короткий пептид КНСС человека в дозе 25 мкг/кг приводит к ускорению сердечных сокращений у животных обоего пола. При этом тахикардия у самцов по сравнению с исходной возрастает на 20,2%, а у самок - 27,2%



Рис. 1. Влияние короткого пептида КНСС человека на чистоту сердечных сокращений крыс самцов (ряд 1), самок (ряд 2)

Исследование электрокардиограммы крыс свидетельствует, что после подкожного введения исследуемого пептида наблюдается изменение ряда показателей. Изменение показателей у экспериментальных крыс после подкожного введения короткого пептида человека в дозе 25 мкг/кг, связано с увеличение транспорта ионов кальция через специфические каналы атипических кардиомицетов с ускорением проведения им пульса по проводящей системе сердца. Изучение вазоактивного эффекта V-H производят минимум на двух объектах: кровеносных сосудах брыжейки и перепонки лапок лягушки на изолированных ушах кролика.[3]

.3 Влияние короткого пептида КНСС человека на системное артериальное давление на примере котов и кроликов

Исследование действия короткого пептида КНСС человека на системное артериальное давление изучалось в остром опыте на 36 самках кроликов массой 2500 г и на кошках 12 самцах малого 200+150 под уретановым наркозом. Наркотическое вещество вводилось внутрибрюшинно в виде 10% раствора на дистиллированной воде. Исследуемый пептид растворялся в разных дозах в 0,5 мл 9%-го раствора хлорида натрия и вводился в бедренную вену со скоростью 0,1 мл/с. Регистрация артериального давления производилось с помощью ртутного манометра, соединенного резиновой трубкой с канюлей, введённой в общую сонную артерию. Запись показаний артериального давления осуществлялась на электрокимографе при помощи писчика манометра. Каждая последующая доза препарата вводилась не ранее, чем через 5 минут после установления артериального давления на исходных цифрах после предыдущего эффекта.

Короткий пептид КНСС человека исследовался в остром опыте на кошках и кроликах, которым он вводился внутривенно в дозах 4,8,16,32 мкг/кг. В ходе опыта регистрировалось артериальное и амплитуда пульсовой волны после введения каждой дозы пептида. Полученные научные факты свидетельствуют, что после инъекции исследуемого пептида наблюдалось закономерное повышение артериального давления и увеличение пульсовой волны, величина которых и время действия зависят от вводимой дозы пептида.

Таким образом, внутривенное введение короткого пептида КНСС человека вызывает у экспериментальных животных повышение системного артериального давления и амплитуды пульсовой волны, которое зависит от вводимого препарата.

Таблица 4

Влияние короткого пептида КНСС человека на показатели артериального давления и острых опытах на кроликах

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Доза короткого пептида (мкг/кг) | Исходное артериальное давление | Максимальное артериальное давление после введения мм.рт.ст | Прирост в % к исходному артериальному давлению мм.рт.ст | Артериальное давление латентного периода мм.рт.ст |
| 4,0 | 110,1 | 121,0 | 10,0 | 138,0 |
| 8,0 | 114,1 | 137,3 | 20,3 | 114,0 |
| 16,0 | 111,9 | 148,6 | 32,8 | 66,0 |
| 32,0 | 115,0 | 161,0 | 40,8 | 30,0 |

При этом полученные научные факты свидетельствуют о более выраженном возрастании амплитуды пульсовой волны в сравнении с показателями системного артериального давления, что, несомненно, зависит от преимущественного влияния изучаемого пептида на силу сокращения сердца, что описывалось выше.

.4 Влияние короткого пептида КНСС человека в регуляции иммунитета и стресса

Попутное исследование В.С. Бахтиновой влияния короткого пептида КНСС человека (V-H) на массу тимуса, печени, почки, сердца и органов мишеней половых стероидов - матки, яичников, тестикулов, простаты, метаболической мышцы, свидетельствуют об уменьшении массы тимуса, увеличение массы печени, почек и сердца у экспериментальных крыс, косвенно указывает на два эффекта, опосредуемых через специфические рецепторы: участие короткого пептида в регуляции метаболизма, участие в адаптационных процессах стресс - реакции. На последний процесс указывал А.П. Бахтинов (1997), который повышение тонусов сосудов связывал с наличием в них специфических рецепторов уротензина, а изменение иммунореактивности в крови студентов перед экзаменами и зачетами - с частием этого пептида в стрессовых реакциях и адаптации. Ряд научных исследований косвенно свидетельствует об участии уротензина 2 в развитии стресс - реакции. В частности Balment в 1998 гоуд опубликовал факты, свидетельствующие о стимуляции уротензином 2 стероидной активности АКТГ у камбалы, выражающейся в секреции кортизола.

В связи с влияние уротензина 2-короткого пептида КНСС человека н организм экспериментальных животных С.А. Лушкина в 2004 году провела ряд опытов с гиперволемией и экспериментальным стрессором - Антиортастатическое плаванием белых мышей в сочетании с введение короткого пептида КНСС человека и без него, а также с введение им по 1 мл 0,9% ного раствора хлорида натрия.

Сравнивая изменение массы тимуса мышей летом и в покое и после плавания при получении им короткого пептида КНСС человека также отмечается, что в покое у самцов тимус уменьшается в 1,6 раза, а у самок в 1,41 раза, что согласуется тоже с большей устойчивостью самок к стрессу.

Антиортастатическое плавание способствует росту количества телец Гассаля преимущественно у самок, получивших физраствор и июле и январе, а также летом после получения короткого пептида КНСС человека. Эти наблюдения свидетельствуют о влиянии на стресс и адаптацию как водно-солевой нагрузки, так и введении короткого пептида КНСС человека.

Сезонные различия степени стресса в летний и зимний периоды, вероятно, объясняются тем, что мышевидные грызуны наиболее активны в сумеречное время суток и наименее активны в дневное время.

В связи с указанием В.С. Бахтиновой (1986), что на введение крысам препарата V-H реагирует щитовидная железа, и попутно был исследован этот орган. После введения подкожно пептида в количестве 25 мкг/кг растворенного в физрастворе, наблюдались некоторые различия в структуре этой железы и надпочечников. Таким образом, анализ структуры изучаемых органов и желез беспородных крыс показал, что спустя 3 часа после первого получения пептида КНСС человека у них возникает компенсаторный рост толщины пучкового и сетчатого слоев надпочечников и структуры щитовидной железы, что связывается с влиянием изучаемого пептида на стресс.

.5 Влияние короткого пептида КНСС человека на работоспособность мышц

Исследования С.А. Лушкиной (2004) свидетельствуют, что при плавании мышей в артиортастатическом положении, утомление наступало у самцов и самок быстрее зимой при получении изотонического раствора хлорида натрия по сравнению с животными обоего пола, получавшим короткий пептид КНСС человека, более чем в 2 раза, а летом - наоборот, исследуемый пептид снижал работоспособность (время плавания до утомления) как у самок так и самцов. При этом у самцов утомляемость наступала в сравнении с животными, получавших только изотонический раствор хлорида натрия, в 3,28 раза, а у самок при тех же условиях - в 1,76 раза.

Таблица 5

Время плавания мышей до утомления в антиортастатическом положении на фоне вводимых веществ, мин.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Вводимые вещества | Зима - январь | | Лето - июль | |
|  | самки | самцы | Самки | самцы |
| Физиологический раствор | 34,43 | 12,29 | 75,71 | 131,14 |
| Пептид КНСС человека | 70,33 | 35,14 | 42,88 | 40,00 |

каудальный нейросекреторный человек животное

Глава 4. Этологическое исследование «Наблюдение поведенческих реакций самок мышей»

Изучение индивидуального поведения лабораторных животных имеет значение в определении реакции нервной системы у них как при стрессе, так и при воздействии различных химических и физических факторов (Литвинов, 1990; С.С. Крылов, 1995; О.В. Перепелкина, 1998; Л.И. Бугаева с соавт., 1999 и др.).

С.А. Лушкина (2004) для этого использовала тест “открытое поле” (В.П. Пошивалов, 1982), где учитываются не только объем и структура поведения, но и вероятность перехода одних паттернов в другие, что позволяет учесть тонкие различия эффектов исследуемых веществ и факторов (А.В. Колуев, 2001). В этом эксперименте индивидуальное поведение животных реализуется в виде графических структур. При этом изменение паттернов можно рассматривать как изменение или нарушение поведения, обусловленные психогенными факторами (Т.И. Белова с соавт., 1985).

При проведении этологических исследований были изучены пять интегральных характеристик поведения животных: эмоциональная реактивность (ЭР); эмоциональная тревожность (ЭТ); ориентировочно-исследовательская активность (ОИА); коэффициент подвижности (КП); коэффициент продуктивности перемещения (КПП).

Исследование психотропного действия пептидов и их аналогов весьма актуально. Подобные экспериментальные изучения проведены с группой эндогенных опиатов, пептидов-анальгетиков, пептидов сна, антипсихотропных пептидов, пептидов модуляторов пищевого и питьевого поведения, настроения и чувств и многих других (В.Д. Бахарев, 1985). В настоящее время не ослаб интерес к изучению этой функции у различных биологически активных веществ, продолжается поиск эндо- и экзогенных регуляторов адаптации, которые, по заключению И.П. Ашмарина (1999), представляют интерес не только в фундаментальном плане, но и в практическом. Относительно изучения короткого пептида КНСС до работы С.А. Лушкиной имелось лишь одно сообщение об исследовании поведенческих реакций самцов крыс методом «открытого поля, проведенное после однократного получения ими короткого пептида КНСС человека в дозе 8 мкг/кг, что вызвало у животных реакцию «оглушения», наиболее выраженную в начале исследования. Поэтому настоящее исследование является, актуальным и по сей день.[3]

В эксперименте С.А. Лушкиной использовались мыши обоего пола, т. К. В.С. Бахтиновой доказано антиандрогенное и антиэстрогенное действие кроткого пептида КНСС человека. Самки и самцы мышей получали по 2,5 мкг/кг короткого КНСС человека в 1 мл 0,9% раствора хлорида натрия. Первая группа получала пептид 1 раз; вторая группа - 2 дня подряд; третья группа - 3 дня подряд. Первая группа мышей исследовалась первый день, вторая - во второй, третья - в третий день. После инъекции пептида поочередно 30 минут проводилось исследование поведения мышей каждой группы в камере 40\*40\*40, сделанной из дерева и окрашенной в белый цвет. Дно камеры делили на 16 равных квадратов, в центре которых делали отверстия диаметром в з см - «норки». Исследование проводилось в июле. При этом соблюдались следующие условия:

. Отсутствие посторонних шумов в помещении, где проводился эксперимент

2. Отсутствие фиксированного освещения

Такие условия позволяют минимизировать внешние влияния на ход опыта и сохранить естественную активность животных. Поведение животных изучалось индивидуально при однократном тестировании в каждой группе. В опыте использовано 140 особей обоего пола. Животные с преобладанием оборонительной реакции на новые ситуационные условия, согласно методическим рекомендациям, из проводимого эксперимента исключались.

В дальнейшем у всех животных учитывалось время, приходящееся на одну реакцию, доля времени паттерна среди других в течение наблюдения за животными и вероятность перехода из одного элемента поведения в другой для экспериментальной группы. При анализе результатов исследования для каждого животного были изучены интегральные характеристики поведения: эмоциональная реактивность, эмоциональная тревожность, ориентировочно - исследовательская активность, коэффициент подвижности. Все паттеры в каждой группе обрабатывались математически. Затем проводили анализ граф - структуры, во всех исследованных группах животных.

Результаты исследования свидетельствуют, что короткий пептид КНСС человека снижал у мышей по сравнению с физиологическим раствором хлорида натрия при однократном введении объема СУ в 3,7 раза. Все эти поведенческие реакции мышей данной группы свидетельствовали о стрессе, вызванном первым введением исследуемого пептида по сравнению с реакцией, вызванной введение 0,9%-го раствора хлорида натрия.

После второго введения исследуемого пептида КНСС человека у самцов в сравнении с особями того же пола, получивших дважды изотонический раствор хлорида натрия, наблюдалось уменьшение числа паттернов в 1,15 раза. Эти результаты опыта свидетельствуют о небольшом стрессогенном действия пептида после второго его введения мышам - самцам, слабо отразившемся на их эмоциональном состоянии по сравнению с изотоническим растворов хлорида натрия.

После третьего введения мышам - самцам исследуемого пептида КНСС человека по сравнению с его растворителем в той же группе животных снижало объем паттерна в 1,78 раза, зато несколько увеличилось число паттерна «стойка с упором»: с 0 до 1,38. Подобные наблюдения свидетельствуют, что по мере увеличения кратности введения исследуемого пептида в структуре поведения возрастал процесс адаптации самцов мышей, хотя сохранялся паттерн ДНМ, характерный для синдрома адаптации.

После первой инъекции короткого пептида КНСС человека в отличие от его растворителя коэффициент продуктивности перемещения у самок снижался в 5,92 раза. По всей видимости, однократное введение исследуемого пептида, как и у самцов, взывало у них развитие стресса - более выраженного, чем при введении 1 мл физраствора.

После второго введения экзогенного короткого пептида КНСС паттерн «убегание» у самок в сравнении с изотоническим раствором хлорида натрия понижался в 4,58 раза, что свидетельствует о нарастании адаптаций у особей этого пола при получении пептида по сравнению с 0,9% раствором хлорида натрия.

При троекратном получении короткого пептида КНСС человека мышей обоего пола по сравнению с той же процедурой с 0,9% раствором хлорида натрия достоверных изменений в их паттернах «вертикальная стойка», «обнюхивание», «сидит», и «норка» не отмечалась.

Анализ полученных результатов данного исследования свидетельствует, что:

. Самки более стрессоустойчивы к короткому пептиду КНСС человека после первой его инъекции, чем самцы

2. Дважды и трижды введённый мышам обоего пола исследуемый пептид вызывает у них достоверную стрессовую реакцию

. Однократное и двукратное введение короткого пептида КНСС человека нивелирует половые отличия в поведении мышей обоего пола, что можно связать с антиандрогенным и антиэстрогенным эффектами данного пептида

. Повторное введение короткого пептида КНСС человека, вероятно, несколько активирует некоторые адаптивные механизмы, что более выражено после трехкратного его введения мышам. При этом адаптивные механизмы на фоне вводимого короткого пептида КНСС человека у самцов выражены больше, чем у самок.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Каудальная нейросекреторная система имеет очень важное физиологическое значение. Ее гормоны, особенно уротензин II имея специфические рецепторы в скелетной и гладкой мускулатуре, в гладкомышечных и других клетках и тканях, поэтому его биологическое действие многосторонне. Он влияет на сократительную функцию сердца, регулирует артериальное давление, тонус артерий и вен мышечного типа, влияет на процесс микроциркуляции в органах и тканях, что доказано экспериментально.

Исследуя функцию КНСС, а в частности уротензина II В.С. Бахтиновапоказала, что перфузия раствором уротензина в дозе 2,4,6,8 мкг/мл изолированного сердца лягушки вызывает по мере увеличения концентрации препарата в перфузате возрастает частота и амплитуда, сила сердечных сокращений.

Исследуя влияние короткого пептида КНСС на электрокардиограмму при введении его подкожно крысам, свидетельствовало о сужении интервала Q-S и увеличения зубцов электрокардиограммы.

При внутривенном введении уротензина II кроликам и котам по мере нарастания концентрации гормона от 10,0 до 25,0 мкг/кг вызывает возрастание артериального давления, учащение сердцебиения и частоты дыхания, эти эффекты постепенно возвращались к исходным показателям на 60 минуте эксперимента.

При увеличении концентрации U II в перфузате через артерию уха кроликов количество оттекаемых капель значительно уменьшалось на этот эффект не влияет альфа - адреноблокатор, что свидетельствует о прямом действии данного гормона на гладкие миоциты артерий

При сорокодневном ежедневном введении уротензина II в дозе 25 мкг/кг крысам у особей обоего пола вызывает длительную контрацепцию (4,5 месяца). При первых родах экспериментальные самки приносили в 3 раза меньше крысят, чем контрольные. У экспериментальных самок крыс второго и третьего поколения не наблюдалось уменьшения потомства и никаких заболеваний.

Выводы:

. КНСС - древняя гуморальная регуляторная система, регулирующая практически все органы и ткани позвоночных животных и человека

. Наиболее биологически активным гормоном КНСС из известных четырех уротензинов является U-II.

. Основные биологические эффекты U-II - это вазоактивный, кардиотонический, контрацептивный и иммуногенный.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Авакян, О.М. Новая модель динамической работы мелких лабораторных животных [Текст] / О.М. Авакян, Э.А. Ширинян // Бюлл. Эксперим. Биологии и медицины. - 1997. - Т.84, №9.- С.375-377.

. Агаджанян, Н.А. К проблеме биологических ритмов [Текст] / Н.А. Агаджанян // Функциональное состояние человека в условиях переезда в другие поясные зоны: матер. науч.-метод. Конференции.- Иркутск,1997.- С.3-3. А.П. Бахтинов «Каудальная нейросекреторная система»

. Анищенко, Т.Г. Половые аспекты проблемы стресса и адаптации [Текст] / Т.Г. Анищенко: автореф. дис. … докт. Биол. наук. - Саратов, 1993.

. Ашмарин, И.П. Регуляторные пептиды: происхождение и регуляция [Текст] / И.П. Ашмарин // Эвол. биохим. Физиологии.- 1982. - Т.18.- С.3-10.

. Ашмарин, И.П. Физиологически древние регуляторные пептиды в новейших системах высших позвоночных [Текст] / И.П. Ашмарин // Эвол. биохим. Физиологии. - 1986. - Т.22, №4. - С.369-375.

. Ашмарин, И.П. Нейропептиды в синаптической передаче [Текст] / И.П. Ашмарин, М.А. Каменская // Итоги науки и техники. Физиология человека и животных.- М.: ВИНИТИ, 1988. - 184 с.

. Бабичев, В.Н. Нейроэндокринная регуляция репродуктивной системы [Текст] / В.Н. Бабичев. - Пущино: ОНТЦ ПНЦ РАН, РФФИ, 1995.- 227 с.

.Бакл, Дж. Гормоны животных [Текст] / Дж. Бакл. - М.: Мир, 1986. - 88 с.

. Бахарев, В.Д. Пептиды-регуляторы (молекулярная регуляция мозга) [Текст] / В.Д. Бахарев. - М.: Знание,1985. - 64 с.

. Бахтинов, А.П. Исследование биологической активности гомогената спинного мозга человека на белых крысах [Текст] / А.П. Бахтинов // Научные труды Владивостокской городской клинической больницы скорой помощи.- Владивосток: Приморское книжное издательство, 1975. - С.215-216.

. Бахтинов, А.П. Морфофункциональные исследования каудального отдела спинного мозга человека и млекопитающих животных [Текст] / А.П. Бахтинов // Состояние и перспективы развития морфологии: материалы Всксоюз. совещ. - М.: Наука, 1979. - С.247-248.

. Бахтинов, А.П. Способ выявления биологически активных веществ в животных тканях непрямой гемаггмотинацией [Текст] / А.П. Бахтинов // Удостовер. на рацпредложение, выд. БРИЗ ВГМИ. 02.11.1973.

. Бахтинов, А.П. Способ получения вещества, обладающего кардиоотоническим и гипертензивным действием [Текст] / А.П. Бахтинов, К.А. Мещерская, В.С. Бахтинова // Авт. св-во СССР № 669015,выд. Госкомитетом по изобр. и откр. В 1979 г. Приоритет от 09.03.1978.