

ВЛИЯНИЕ КАРБАХОЛИНА И ГЛИЦИЛПРОЛИНА (GLY-PRO) НА СЕКРЕТОРНУЮ ФУНКЦИЮ ЖЕЛУДКА В ЗАВИСИМОСТИ ОТ РЕАКТИВНОСТИ ЦНС У КРЫС

Т. А. Томова¹, Т. А. Замощина², Е. Ю. Просекина³, М. В. Светлик²

В экспериментах с помощью кластерного анализа результатов исследования поведенческой активности крыс в “открытом поле” выделено 3 группы животных с разными типами реагирования на первое предъявление теста — активно-поисковым (все исследуемые реакции выражены), промежуточным и пассивно-оборонительным (самый низкий уровень активности) типами. Установлены различия в показателях стимулированной карбахолином желудочной секреции у крыс разных групп: больший объем секрета желудка и меньшую переваривающую способность желудочного сока наблюдали у крыс с активно-поисковым и промежуточным типами поведения в “открытом поле”, в отличие от крыс с пассивно-оборонительным типом поведения. При сочетанном воздействии холиномиметика и глицилпролина (Gly-Pro) у крыс с активно-поисковым типом поведения в “открытом поле” снижалась протеолитическая активность желудочного сока, у крыс с промежуточным типом поведения уменьшался объем желудочного секрета, а у крыс с пассивно-оборонительным типом поведения увеличивался объем сока и уменьшалась его переваривающая способность.

Ключевые слова: реактивность нервной системы; карбахолин; глицилпролин (Gly-Pro); желудочная секреция; крысы; поведение в “открытом поле”.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время множество фактов указывают на то, что исходное состояние и индивидуальные свойства центральной нервной системы определяют функциональную деятельность внутренних органов, обменных, иммунобиологических реакций и т.п. [3, 8, 15]. Диапазон реакций в ответ на возмущающие факторы у каждого организма обусловлен генотипом и предыдущим опытом, при этом в специфике ответа задействована единая взаимосвязь психоэмоционального, вегетативного и гормонального статусов [1, 13]. Состояние нервной системы, соотношение процессов возбуждения и торможения в ней определяют функциональную активность и патофизиологические процессы в желудочно-кишечном тракте [17], деятельность которого регулируется различными пептидами, в частности и через парасимпатические пути [18, 19]. Большой интерес в этом отношении представляют пролинсодержащие пептиды (Pro-Gly-Pro, Pro-Gly, Gly-Pro и др.), обладающие уникальным спектром физиологической активности, включая регуляцию гомеостаза слизистой оболочки пищеварительной системы [14].

Цель работы — выявление особенности влияния карбахолина и глицилпролина (Gly-Pro) на объем, кислотность и протеолитическую активность желудочного сока у крыс в зависимости от реактивности центральной нервной системы.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования выполнялись с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директиве Европейского сообщества (86/609/ЕС), и согласно рекомендациям руководства по лабораторным животным [11].

Эксперимент проведен на 56 крысах-самцах линии Вистар массой (210 ± 30) г (ФГБУ “НИИ Фармакологии” СО РАМН, Томск). Крысы содержались в контролируемых условиях окружающей среды в клетках по 6 особей при свободном доступе к воде. Освещение в помещениях — естественно-искусственное. Вновь прибывшие животные находились на карантине 14 дней.

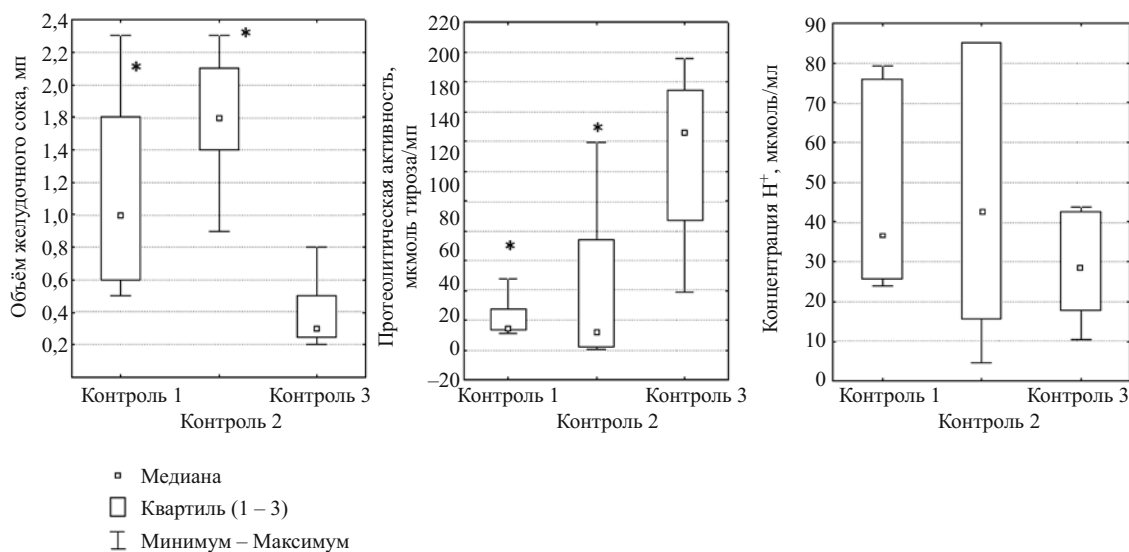
Для оценки реактивности нервной системы использовали общеповеденческий тест — методику “открытое поле” [2]. Тестирование животных проводилось с 8 до 10 ч утра в период летнего солнцестояния (июнь).

После 24 ч голодания крыс оперировали под эфирным наркозом с наложением лигатуры на пилорический отдел желудка. Через 90 мин после операции в разных сочетаниях вводили: а) стимулятор желудочной секреции; б) пептид Gly-Pro; в) физиологический раствор. В качестве стимулятора желудочной секреции использовали неизбирательный агонист м, н-холинорецепторов — карбахолин (“Reanal”, Венгрия), являющийся аналогом ацетилхолина — медиатора, запускающего процесс секреции. Карбахолин вводили внутримышечно в дозе 25 мкг/кг. Вызванная секреция с момента введения стимулятора продолжалась 45 мин. Пептид глицилпролин (Gly-Pro, “Senn Chemicals”, Schweiz) в дозе 1 мг/кг вводили внутривентриально в объеме 1 мл на 200 г массы крысы. В контрольных опытах животные получали физиологический раствор

¹ Томский государственный педагогический университет, 634061, Томск, ул. Киевская, 60.

² ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России, 634050, Томск, Московский тракт, 2.

³ Национальный исследовательский Томский государственный университет, 634050, Томск, пр. Ленина, 36.



Показатели стимулированной карбахолином желудочной секреции у крыс с разным типом поведения в “открытом поле”

Примечания: контроль 1 — крысы с активно-поисковым типом поведения; контроль 2 — крысы с промежуточным типом поведения; контроль 3 — крысы с пассивно-оборонительным типом поведения, * показатели, достоверно отличающиеся от контроля 3 при 5 % уровне статистической значимости различий ($p < 0,05$).

в эквивалентных количествах. Использовали только карбахолин в качестве стимулятора.

В рамках данной работы были выполнены следующие серии: контроль 1 — крысам с активно-поисковым типом поведения в “открытом поле” вводили физиологический раствор одновременно с карбахолином ($n = 6$); контроль 2 — крысам с промежуточным типом поведения в “открытом поле” вводили физиологический раствор одновременно с карбахолином ($n = 12$); контроль 3 — крысам с пассивно-оборонительным типом поведения в “открытом поле” вводили физиологический раствор одновременно с карбахолином ($n = 10$); опыт 1 — крысам с активно-поисковым типом поведения в “открытом поле” вводили Gly-Pro одновременно с карбахолином ($n = 8$); опыт 2 — крысам с промежуточным типом поведения в “открытом поле” вводили Gly-Pro одновременно с карбахолином ($n = 12$); опыт 3 — крысам с пассивно-оборонительным типом поведения в “открытом поле” вводили Gly-Pro одновременно с карбахолином ($n = 8$). По окончании времени секреции крыс декапитировали, извлекали желудок, содержимое которого подвергали анализу. О секреторной функции желудка животных судили по объему отделяемого секрета, активности H⁺, протеолитической активности желудочного сока. Концентрацию H⁺, отражающую кислотность, определяли методом pH-метрии желудочного сока с последующим вычислением по таблице антилогарифмов и выражали в мкмоль/мл [10].

Определение протеолитической активности желудочного сока проводили по методу Ансона и Мирского в модификации А. М. Уголева [5], используя спектрофотометр СФ-2000, и выражали в мкмоль тирозина на мл желудочного сока.

Статистические процедуры проводили с помощью прикладного пакета Statistica 8.0. Вычисляли медиану анализируемого показателя (Me), 1-й и 3-й квартили (Q1; Q3). Статистический анализ достоверности различий между выборками проводили с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни. Значимыми считались различия при $p < 0,05$. Формирование групп крыс с разной реактивностью нервной системы согласно тесту “открытое поле” проводили с помощью кластерного анализа.

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки РФ “Механизмы адаптации кардиомиоцитов в условиях ишемического и реперфузионного повреждения миокарда в эксперименте” № проекта 141.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время прогрессивным направлением в исследованиях считается сочетание традиционных физиологических наблюдений с анализом “поведенческих” реакций [4]. Ориентировочно-исследовательская реакция способствует восприятию, анализу и оценке значимости раздражителя для адекватного ответа со стороны организма индивида [9]. Первое предъявление животному “открытого поля” является стрессорным фактором для него и сопровождается ориентировочной реакцией на новизну, гипо- или гипермоторикой, эмоциональными реакциями [2]. В наших экспериментах с помощью кластерного анализа поведенческой активности крыс в “открытом поле” выделено 3 группы животных с разными типами реагирования нервной системы на стресс, которые отражались в 3 типах поведения в “открытом поле” — активно-поисковом (все исследуемые реакции выражены), промежуточном и пассивно-оборонительном (са-

мый низкий уровень активности), что обусловлено генетическими особенностями и предыдущим опытом животного.

Связь индивидуальных особенностей нейроэтологических показателей в тесте “открытое поле” с индивидуальным нейрохимическим паттерном подтверждена прямыми исследованиями уровня активности некоторых нейромедиаторных систем отечественными и зарубежными исследователями [6, 21]. Показано, что повышение активности норадренергической и дофаминергической систем коррелирует с повышенным уровнем горизонтальной активности [3], которая в наших экспериментах была характерна для крыс с активно-поисковым поведением. Напротив, при повышенной активности холинергической и серотонинергической систем уровень двигательной активности снижался [3], а в наших экспериментах низкую двигательную активность наблюдали у крыс с пассивно-оборонительным поведением. Расчеты вторичных показателей вариационной пульсометрии ЭКГ у крыс, произведенные в работе И. В. Червовой, указали на более высокий тонус симпатической нервной системы у животных как с активно-поисковым, так и с пассивно-оборонительным типом поведения в тесте “открытое поле”, по сравнению с промежуточным типом [16].

Как известно, контроль центральной нервной системы функций желудка опосредован симпатическими и парасимпатическими путями, где парасимпатическое звено является функционально доминирующим [20].

В наших экспериментах установлены различия в показателях стимулированной карбахолином желудочной секреции у крыс с разным типом реактивности нервной системы. У крыс с пассивно-оборонительным типом поведения объем желудочного сока был значительно ниже, тогда как протеолитическая активность превышала данный показатель, по сравнению с крысами с активно-поисковым и промежуточным типами поведения ($p < 0,05$). Объем, активность H^+ и переваривающая способность стимулированного желудочного сока у крыс с активно-поисковым типом поведения не име-

ли значимых отличий от аналогичных показателей крыс с промежуточным типом (рисунок). Таким образом, введение карбахолина в контрольных опытах обусловило больший объем секрета желудка у крыс с активно-поисковым и промежуточным типами поведения, в отличие от крыс с пассивно-оборонительным типом, что связано, возможно, с разным уровнем кровотока в желудке. Пищеварительные железы обильно снабжены кровеносными сосудами, из которых в секреторные клетки поступают неорганические вещества и низкомолекулярные органические соединения. Они проходят через барьеры, которые располагаются между просветом капилляров и цитоплазмой секреторной клетки. Поэтому состояние кровоснабжения играет важную роль в секреции желудочного сока.

Кроме того, полученные данные указывают на то, что главные клетки слизистой желудка у крыс с пассивно-оборонительным типом поведения, действительно, более чувствительны к холинергической стимуляции, чем у остальных групп животных. Возможно, это связано с разной плотностью распределения м-холинорецепторов на главных клетках и в эндотелии мелких кровеносных сосудов. Вместе с тем нельзя исключить и повышенной чувствительности рецепторов к холиномиметику. Во всяком случае для других органов и тканей такие факты известны [7, 12].

При сочетанном воздействии холиномиметика и Gly-Pro у крыс с активно-поисковым типом поведения в “открытом поле” в 3,8 раза снижалась переваривающая способность желудочного сока, а у крыс с промежуточным типом поведения — уменьшался объем желудочного секрета (таблица). Такой эффект пептида указывает на существование функционального антагонизма между ним и м-холинорецепторами, расположенными на главных клетках желудка и в эндотелии мелких кровеносных сосудов.

У крыс с пассивно-оборонительным типом поведения Gly-Pro на фоне карбахолина увеличивал объем секрета желудка и снижал в среднем в 3,4 раза протеолитическую активность сока, тем самым демонстри-

Влияние Gly-Pro (1 мг/кг внутривнутрино однократно) на показатели стимулированной карбахолином (25 мкг/кг внутримышечно однократно) желудочной секреции у крыс с разным типом поведения в “открытом поле” Me (Q1; Q3)

Показатель	Группа					
	с активно-поисковым типом поведения в “открытом поле”		с промежуточным типом поведения в “открытом поле”		с пассивно-оборонительным типом поведения в “открытом поле”	
	Контроль 1, n = 6	Опыт 1, n = 8	Контроль 2, n = 12	Опыт 2, n = 12	Контроль 3, n = 10	Опыт 3, n = 8
Объем сока, мл	1,2 (0,8; 1,8)	1,8 (1; 2,8)	1,8 (1,6; 2,1)	1,2 * (1,0; 1,4)	0,5 (0,5; 1,2)	1,5 * (1,0; 2,1)
Концентрация H^+ , мкмоль/мл	36,7 (25,7; 75,9)	61,7 (39,1; 80,2)	42,8 (15,7; 85,1)	31,8 (12,0; 69,2)	28,4 (10,5; 42,7)	29,8 (25,5; 50,7)
Протеолитическая активность, мкмоль тирозина/мл	14,6 (13,6; 27,2)	1,0 * (0,8; 1,6)	11,4 (1,9; 74,1)	35,4 (11,3; 57,8)	146,3 (38,9; 160,9)	42,7 * (20,2; 83,7)

Примечания: Me (Q1; Q3) — медиана (1-й и 3-й квартили); n — количество крыс в серии; * отличия статистически значимы при $p < 0,05$ в данной группе животных по сравнению с контрольной, не получавшей пептид.

руя неоднозначный эффект в отношении м-холинергических влияний на эндотелиальные клетки сосудов (таблица).

Таким образом, особенности ответных реакций со стороны секреторных клеток желудка у крыс после введения холиномиметика как самостоятельно, так и в сочетании с Gly-Pro, определяются индивидуальными особенностями нейроэтологических реакций животных в тесте “открытое поле”.

ВЫВОДЫ

1. С помощью кластерного анализа показателей поведенческой активности крыс в тесте “открытое поле” выделено 3 группы животных с разными типами реагирования нервной системы на стресс — активно-поисковым (все исследуемые реакции выражены), промежуточном и пассивно-оборонительным (самый низкий уровень активности).

2. Установлены различия в показателях стимулированной карбахолом желудочной секреции у крыс разных групп: больший объем секрета желудка и меньшую переваривающую способность желудочного сока наблюдали у крыс с активно-поисковым и промежуточными типами поведения в “открытом поле”, в отличие от крыс с пассивно-оборонительным типом поведения.

3. Gly-Pro (1 мг/кг внутривентриально однократно) на фоне карбахолина у крыс с активно-поисковым типом поведения в “открытом поле” снижал протеолитическую активность желудочного сока, у крыс с промежуточным типом поведения уменьшал объем желудочного секрета, а у крыс с пассивно-оборонительным типом поведения увеличивал объем сока и уменьшал его переваривающую способность.

ЛИТЕРАТУРА

1. А. С. Батуев, *Высшая нервная деятельность*, Высшая школа, Москва (2008).

2. Я. Буреш, О. Бурешова, Дж. Хьюстон, *Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения*, Высшая школа, Москва (1991).
3. Х. Ю. Исмаилова, Т. М. Агаев, Т. П. Семенова, *Индивидуальные особенности поведения: моноаминергические механизмы*, Нурлан, Баку (2007).
4. Т. С. Калинина, А. А. Шимширт, Н. В. Кудряшов и др., *Эксперим. и клин. фармакол.*, **77**(2), 3 – 7 (2014).
5. Н. А. Кривова, Г. Ц. Дамбаев, В. Е. Хитрихеев, *Надэпителиальный слизистый слой желудочно-кишечного тракта и его функциональное значение*, МГП “РАСКО”, Томск (2002).
6. О. Ю. Майоров, *Клин. информатика и телемед.*, **7**(8), 21 – 32 (2011).
7. В. В. Майский, *Фармакология*, Ч. 1 – 2, Москва (2003).
8. Р. С. Мирзоян, Т. С. Ганьшина, Н. А. Хайлов и др., *Эксперим. и клин. фармакол.*, **77**(3), 3 – 8 (2014).
9. А. Б. Мулик, *Вестник ВолГУ*, **7**(1), 105 – 116 (2001).
10. В. Г. Мыш, *Секреторная функция желудка и язвенная болезнь*, Наука, Новосибирск (1987).
11. *Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях*, Н. Н. Каркищенко, С. В. Грачев (ред.), Москва (2010).
12. П. В. Сергеев, Н. Л. Шимановский, В. И. Петров, *Рецепторы физиологически активных веществ*, Москва, Волгоград (1999).
13. П. В. Симонов, *Журн. высшей нервн. деят.*, **31**(1), 12 (1981).
14. Т. М. Фалалеева, Г. Е. Самонина, Т. В. Береговая и др., *Бюл. эксперим. биол. и мед.*, **149**(1), 30 – 33 (2010).
15. Л. Д. Фирсова, *Эксперим. и клин. гастроэнтерол.*, № 8, 41 – 44 (2013).
16. И. В. Червова, *Автореф. дис. канд. биол. наук*, Барнаул (2007).
17. H. Can Zhu, J. Zhao, Ch. Yue Luo, et al., *J. Mol. Neurosci.*, **47**(1), 15 – 25 (2012).
18. G. Jekely, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**(21), 8702 – 8707 (2013).
19. Y. Tache, *Cur. Med. Chem.*, **19**(1), 35 – 42 (2012).
20. R. A. Travagli, G. E. Hermann, K. N. Browning, et al., *Ann. Rev. Physiol.*, № 68, 279 – 305 (2006).
21. M. Zuckerman, *Psychobiology of personality*, Cambridge Univ. Press., Cambridge (2005).

Поступила 15.12.14

REACTIVITY OF THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM INFLUENCES THE SENSITIVITY OF SECRETORY CELLS OF THE STOMACH TO CARBACHOLINE AND GLYCYL-PROLINE (GLY-PRO)

T. A. Tomova¹, T. A. Zamoshchina², E. Yu. Prosekina³, and M. V. Svetlik²

¹ Tomsk State Pedagogical University, ul. Kievskaya 60, Tomsk, 634061 Russia

² Siberian State Medical University, ul. Moskovskii Trakt 2, Tomsk, 634050 Russia

³ Biological Institute of the Tomsk State University, prosp. Lenina 36, Tomsk, 634050 Russia

In experiments using cluster analysis of the behavioral activity of rats in the “open field” test, the animals were divided into three groups with different types of behavior and response to the first presentation of the test: (i) active-search (all the studied reactions are expressed), (ii) intermediate, and (iii) passive-defensive (lowest level of activity). Differences in the indices of carbacholine-stimulated gastric secretion in rats of different groups were manifested by greater secretion of the stomach and lower digestive capacity of gastric juice observed in rats with active-search and intermediate types of behavior in the “open field” test in contrast to rats with passive-defensive type. Combined administration of cholinomimetic and glycyL-proline (Gly-Pro) lead to decreased proteolytic activity of gastric juice in rats with active-search behavior in the “open field” test, decreased volume of gastric secretion in rats with an intermediate type of behavior, and increased volume of juice and its decreased digestive ability in rats with passive-defensive behavior.

Keywords: reactivity of the central nervous system; carbacholine; glycyL-proline (Gly-Pro); gastric secretion; rats; behavior in “open field” test.