

# ФАРМАКОЛОГИЯ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА

DOI: 10.30906/0869-2092-2018-81-12-3-6

## ВЛИЯНИЕ ГЛИЦИЛПРОЛИНА НА ПОКАЗАТЕЛИ СТИМУЛИРОВАННОЙ КАРБАХОЛОМ ЖЕЛУДОЧНОЙ СЕКРЕЦИИ У КРЫС В УСЛОВИЯХ МНОГОКОМПОНЕНТНОГО СТРЕССА

Т. А. Томова<sup>1</sup>, Т. А. Замощина<sup>2</sup>, М. В. Светлик<sup>3</sup>

В экспериментах на крысах изучали влияние пептида глицилпролина (Gly-Pro) на стимулированную карбахолом секреторную активность желудка в условиях многокомпонентного стресса. Воздействие стрессирующих факторов (иммобилизация, оперативное вмешательство, процедура инъекции) в различных сочетаниях и последовательности сопровождалось формированием 3 типов ответных реакций желудка на холинергическую стимуляцию его секреции: нормергический, гипоергический и гиперергический. Gly-Pro модулирует холинергические влияния на желудочную секрецию в условиях многокомпонентного стресса, формируя нормергический уровень активности органа у всех животных. Исследование пептида выявило границы нормы реакции разных показателей желудочной секреции у крыс.

**Ключевые слова:** глицилпролин (Gly-Pro); многокомпонентный стресс; карбахол; желудочная секреция.

### ВВЕДЕНИЕ

При стрессе развиваются генерализованные нарушения нейродинамики, возникают повреждения внутренних органов, формируются новые функциональные взаимодействия, которые могут носить как адаптивный, так и патологический характер [6, 9, 15, 18]. Обязательным компонентом реакции организма на стрессорное воздействие являются изменения функций пищеварительного тракта [2, 19]. Желудок — сложный эндокринный орган с уникальной физиологией, биохимией, иммунологией и микробиологией, весьма стресс-чувствителен и часто используется в эксперименте в качестве маркера выраженности стресс-реакции организма [5, 9, 16]. Секреторная активность желудка зависит от многих факторов: наследственных особенностей, в том числе психоэмоциональных, биоритмологических влияний, стрессорных воздействий и, возможно, их последовательности и сочетаний [5, 10, 19].

На основании интенсивности проявления постстрессорных реакций различают: нормергический (преобладание регенеративных явлений), гиперергический (разрушительные явления преобладают над регенеративными) и гипоергический ответ (слабая реакция на воздействие повреждающего агента) [3, 14]. Указанные типы реакций можно сравнить с фазами общего адаптационного синдрома Г. Селье [9]. Они напоминают стадии стресса: гиперергический тип реакции — стадию тревоги, нормергический — стадию резистентности, гипоергический — стадию истощения. Существует представление о том, что

ряд соматических нарушений, в том числе нарушения в слизистой оболочке желудка, наблюдаются тогда, когда факторы внешней среды ведут к напряжению либо ослаблению адаптации и характеризуются гипоергическими или гиперергическими реакциями, смысл которых состоит в компенсации стрессорных повреждений. Если таковая не состоялась, то стрессорные повреждения перерастают в дезадаптацию (болезнь) [3].

Ведущее место в реакции адаптации на стресс и нарушении гомеостаза со стороны желудка занимают пептиды, что продемонстрировано в экспериментах на разных моделях стресса [8, 13, 17]. Значительную роль в регуляции секреторной активности желудка играют высокостабильные в средах короткие пептиды — глипролины (Pro-Gly-Pro, Pro-Gly, Gly-Pro и др.), способные поддерживать гомеостаз слизистой оболочки желудка и оказывать гастропротекторное действие [1, 8].

Цель исследования — изучение влияния Gly-Pro (GP) на стимулированную карбахолом секреторную активность желудка крыс в условиях многокомпонентного стресса.

### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования выполнены с соблюдением принципов гуманности, изложенных в Директиве Европейского общества (86/609/ЕС), и согласно рекомендациям Руководства по лабораторным животным [7]. Опыты проведены на 70 крысах-самцах Вистар массой (210 ± 30) г (ФГБУ “НИИ фармакологии” СО РАМН, Томск), оперированных под эфирным наркозом с наложением лигатуры на пилорический отдел желудка. После 24 ч голодания крысам вводили стимулятор желудочной секреции агонист м, н-холинорецепторов — карбахол (“Reanal”, Венг-

<sup>1</sup> Томский государственный педагогический университет, Россия, 634061, Томск, ул. Киевская, 60.

<sup>2</sup> ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава РФ, Россия, 634050, Томск, Московский тракт, 2.

рия) внутримышечно в дозе 25 мкг/кг и пептид глицилпролин (Gly-Pro, "Senn Chemicals", Швейцария) внутрибрюшинно в дозе 1 мг/кг в объеме 1 мл на 200 г массы тела. Секретция под влиянием стимулятора продолжалась 45 мин. В контрольных опытах вместо пептида животные получали физиологический раствор в эквивалентных количествах.

Крысы были разделены на группы: группе 1 производили одновременно инъекции карбахола и физиологического раствора после операции, группе 2 — инъекции карбахола и GP после операции, группе 3 — инъекции карбахола и физиологического раствора после иммобилизации и операции, группе 4 — инъекции карбахола и GP после иммобилизации и операции, группе 5 — инъекцию физиологического раствора за 30 мин до карбахола после операции; группе 6 — инъекцию GP за 30 мин до карбахола после операции, группе 7 — инъекцию физиологического раствора за 30 мин до карбахола после иммобилизации и операции, группе 8 — инъекцию GP за 30 мин до карбахола после иммобилизации и операции.

Спустя 45 мин после введения карбахола крыс декапировали, извлекали желудок, содержимое подвергали анализу. Секреторную функцию желудка животных оценивали по объему отделяемого секрета, активности  $H^+$ , протеолитической активности желудочного сока. Активность  $H^+$ , отражающую кислотность, определяли методом рН-метрии желудочного сока с последующим вычислением по таблице антилогарифмов и выражали в мкмоль/мл [6]. Определение протеолитической активности желудочного сока проводили по методу Ансона и Мирского в модификации А. М. Уголева [11], используя спектрофотометр СФ-2000, и выражали в мкмоль тирозина. Иммобилизацию осуществляли однократно в течение 18 ч [9], при этом крыс фиксировали на спине за все конечности на операционном столике.

Статистическую обработку данных выполняли в R Core Team (2014). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/> с применением методов проверки нормальности распределений значений в выборках Шапиро — Вилка. Оценку меры статистической значимости различий выполняли с

помощью непараметрических критериев Манна — Уитни (в случае сравнения 2 независимых выборок) и Краскала — Уолиса (в случае сравнения 3 и более независимых выборок). В качестве критерия статистической значимости считали значения при  $p < 0,05$ . Результаты представлены в виде среднего ( $M$ ) и ошибки среднего ( $m$ ).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящем исследовании изучали модулирующее влияние пептида на реакцию стимулированного карбахом желудка крыс в условиях последовательного сочетанного воздействия 3 стрессорных факторов: иммобилизации, оперативного вмешательства и процедуры инъекции.

Инъекции GP одновременно с карбахом после оперативного вмешательства сопровождалась статистически значимым повышением протеолитической активности желудочного сока по сравнению с аналогичным показателем у крыс, получавших физиологический раствор вместо пептида (группы 1 и 2, табл. 1).

Иные результаты получены при введении GP одновременно с карбахом крысам, предварительно иммобилизованным перед операцией. В этом случае пептид увеличивал объем, кислотность и пептическую активность стимулированного желудочного сока по сравнению с соответствующими показателями секрета у крыс, получавших физиологический раствор вместо пептида в аналогичных условиях эксперимента (группы 3 и 4, табл. 1).

Для выявления модулирующего влияния пептида на холинергическое воздействие на секрецию желудка в момент максимального гастропротекторного эффекта GP в дальнейшем его вводили за 30 мин до карбахола. Пептид не вызывал значимых изменений секреторной активности желудка у оперированных крыс (группы 5 и 6, табл. 2).

Наконец, если пептид вводили за 30 мин до карбахола иммобилизованным и оперированным животным, то объем секрета, кислотность и переваривающая способность желудочного сока снижались по сравнению с соответствующими показателями желудочной секреции у крыс, получавших физиологический раствор вместо пеп-

Таблица 1. Влияние одновременного введения GP и карбахола на показатели желудочной секреции у крыс после операционного и иммобилизационного стресса

Показатель	Операция, $M \pm m$		Иммобилизация + операция, $M \pm m$	
	группа 1 кбх + ф.р., $n = 14$	группа 2 кбх + GP, $n = 10$	группа 3 кбх + ф.р., $n = 8$	группа 4 кбх + GP, $n = 7$
Объем сока, мл	$3,9 \pm 0,41$	$4,0 \pm 0,36$	$2,5 \pm 0,27$ $p_2 < 0,05$	$4,4 \pm 0,92$ $p_1 < 0,05$
Активность $H^+$ , мкмоль/мл	$49,8 \pm 8,75$	$41,9 \pm 7,02$	$2,4 \pm 2,20$ $p_2 < 0,05$	$28,1 \pm 11,41$ $p_1 < 0,05$
Протеолитическая активность, мкмоль тирозина	$90,8 \pm 16,40$	$258,7 \pm 30,71$ $p_1 < 0,05$	$97,9 \pm 20,12$	$268,5 \pm 73,76$ $p_1 < 0,05$

Примечания: ( $M \pm m$ ) — среднее  $\pm$  стандартная ошибка среднего;  $n$  — количество животных; кбх — карбахол; ф.р. — физиологический раствор; группа 1 — одновременные инъекции кбх и ф.р. после операции; группа 2 — одновременные инъекции кбх и GP после операции; группа 3 — одновременные инъекции кбх и ф.р. после иммобилизации и операции; группа 4 — одновременные инъекции кбх и GP после иммобилизации и операции;  $p_1 < 0,05$  по сравнению с соответствующим показателем крыс, получавшим ф.р. в данной модели;  $p_2 < 0,05$  по сравнению с соответствующим показателем крыс группы 1.

тида в аналогичных условиях эксперимента (группы 7 и 8, табл. 2).

Таким образом, в экспериментах получены 3 варианта ответа желудка крыс на 4 модификации многокомпонентного стресса: группа 1 — одновременные инъекции физиологического раствора и карбахола после операции; 3 — одновременные инъекции физиологического раствора и карбахола после иммобилизации и операции; 5 — инъекция физиологического раствора за 30 мин до карбахола после операции; 7 — инъекция физиологического раствора за 30 мин до карбахола после иммобилизации и операции. Эти 3 типа ответа желудка характеризовались разным уровнем показателей секреции, что впоследствии способствовало определению характера и принципа действия пептида на исследуемые показатели.

Как известно, понятие “норма” — динамическое соответствие анатомических и физиологических показателей организма изменяющимся условиям среды, т.е. оптимальное выполнение функции с минимальными энергетическими затратами и минимальным структурным вовлечением. В наших экспериментах этому оптимуму [4] соответствовало количество секрета, кислотность и переваривающая способность желудка оперированных крыс 1-й и 5-й групп. Возможно, такая интенсивность ответной реакции желудка на холинергическую стимуляцию при различном сочетании используемых факторов стресса есть результат нормергического (преобладание регенеративных явлений) типа ответа [3]. У крыс 3-й группы объем отделяемого сока и кислотность оказались значительно ниже по сравнению с показателями всех групп животных, тогда как количество аминокислот, образовавшихся в результате протеолиза, не отличалось от такового показателя животных 1-й группы. По-видимому, в данном случае интенсивность проявления ответной реакции со стороны желудка есть результат гиперергического типа ответа (слабая реакция или ее отсутствие на воздействие). Наконец, у крыс 7-й группы получены максимальные величины всех исследуемых показателей желудка, что, вероятно, явилось результатом гиперергического типа ответа. Разная интенсивность ответной реакции же-

лудка на холинергическую стимуляцию при различном сочетании используемых факторов стресса, по-видимому, обусловлена многоканальным нейрогенным контролем через гипоталамо-гипофизарную и симпатoadреналовую системы, где варианты ответной реакции были спровоцированы сочетаниями стрессогенных факторов в различной последовательности.

Согласно учению Н. Е. Введенского о парабиозе, на одном и том же субстрате эффекты, закономерно переходящие от возбуждения к торможению, зависят от количественной характеристики раздражителя (частота, сила) и функциональной подвижности реагирующей структуры. На раздражители возбуждимые ткани отвечают фазной реакцией, характеризующейся пониженной лабильностью, одинаковой во всех случаях, которую Н. Е. Введенский назвал парабиозом [12]. Если допустить, что различное сочетание используемых в наших экспериментах стрессорных факторов сформировали разные функциональные состояния желудка животных и, возможно, разные фазы парабиотической реакции, то на холинергическую стимуляцию мы получили провизорную фазу в случае гиперергического ответа желудочных желез, где наблюдается ослабление функциональных свойств; парадоксальную фазу — в случае гиперергического ответа секреции желудка; тормозную фазу — в случае так называемого нормергического ответа, где ответ на стимуляцию карбахолом остается в пределах оптимальных значений.

Уровень показателей — объем желудочного сока, кислотность, переваривающая способность желудка, сформированные различным сочетанием факторов стресса, были решающими в характере ответа пептида. В одном случае GP усиливал холинергические влияния на показатели желудочной секреции (у крыс с гиперергической направленностью секреторного ответа желудка, 4-я группа), в другом — не оказывал значимого действия (у крыс с нормергической направленностью секреторного ответа желудка, 2-я и 6-я группы), в третьем — ингибировал секрецию у крыс с гиперергическим типом реакции желудка (8-я группа). Последнее согласуется с правилом саморегуляции — “правилом исходного уровня” — направ-

Таблица 2. Влияние предваряющего карбахол введения GP на показатели желудочной секреции у крыс после операционного и иммобилизационного стресса

Показатель	Операция, $M \pm m$		Иммобилизация + операция, $M \pm m$	
	группа 5 ф.р. + кбх, $n = 7$	группа 6 GP + кбх, $n = 10$	группа 7 ф.р. + кбх, $n = 7$	группа 8 GP + кбх, $n = 7$
Объем сока, мл	$4,4 \pm 0,4$	$3,6 \pm 0,39$	$7,4 \pm 0,56$ $p_2 < 0,05$ $p_3 < 0,05$	$4,8 \pm 0,49$ $p_1 < 0,05$
Активность $H^+$ , мкмоль/мл	$52,4 \pm 8,16$	$36,3 \pm 5,28$	$55,5 \pm 11,56$	$28,4 \pm 5,99$ $p_1 < 0,05$
Протеолитическая актив- ность, мкмоль тирозина	$165,4 \pm 20,24$	$168,6 \pm 40,93$	$532,6 \pm 95,44$ $p_2 < 0,05$ $p_3 < 0,05$	$299,6 \pm 43,25$ $p_1 < 0,05$

Примечания: ( $M \pm m$ ) — среднее  $\pm$  стандартная ошибка среднего; n — количество животных; кбх — карбахол; ф.р. — физиологический раствор; группа 5 — инъекция ф.р. за 30 мин до кбх после операции; группа 6 — инъекция GP за 30 мин до кбх после операции; группа 7 — инъекция ф.р. за 30 мин до кбх после иммобилизации и операции; группа 8 — инъекция GP за 30 мин до кбх после иммобилизации и операции;  $p_1 < 0,05$  по сравнению с соответствующим показателем крыс, получавшим ф.р. в данной модели;  $p_2 < 0,05$  по сравнению с соответствующим показателем крыс группы 1 из табл. 1;  $p_3 < 0,05$  по сравнению с соответствующим показателем крыс группы 5.

ление и величина изменений гомеостатической константы под влиянием возмущающего фактора зависит от исходного значения константы. Сравнивая полученные значения после введения пептида при многокомпонентном стрессе, следует обратить внимание на то, что GP сформировал одинаковый уровень стимулированной секреции желудка у всех животных (группы 2, 4, 6, 8) вне зависимости от сочетания стрессогенных воздействий. По-видимому, такие параметры, как 2,5 и 7,4 мл желудочного сока, 2,4 и 55,5 мкмоль/мл активных водородных ионов, 90 – 97 и 532,6 мкмоль тирозина явились установочными параметрами и служили базисом для афферентации и поправок в функции желудка по каналам обратной связи посредством пептида. Таким образом, после стресса GP сформировал границы секреторного ответа: объем желудочного сока 3,6 – 4,8 мл; кислотность секрета 28,1 – 41,9 мкмоль/мл; пептическая активность 168,6 – 299,6 мкмоль тирозина.

GP реализовывал компенсаторно-приспособительные реакции желудка, выступая в роли эндогенного биологически активного вещества как элемента системы саморегуляции, призванного нормализовать (сохранить) секреторную функцию желудка при экстремальных состояниях и способствовать оптимальным условиям переваривания и усвоения пищи.

Возвращаясь к учению Н. Е. Введенского о парабиозе и допуская предположение о том, что в экспериментах при различном сочетании факторов стресса получены фазы парабиоза на холинергическую стимуляцию, можно полагать, что пептид запускал парабиотическую реакцию. Вероятно, GP формировал тормозную фазу парабиоза, создавая границы секреторного ответа желудка на уровне нормергического типа, предупреждая таким образом перевозбуждение органа и возможное развитие патологии.

## ВЫВОДЫ

1. Воздействие стрессирующих факторов (иммобилизация, оперативное вмешательство, процедура инъекции) в различных сочетаниях и последовательности сопровождаются формированием 3 типов ответных реакций желудка на холинергическую стимуляцию его секреции.

2. GP модулирует холинергические влияния на желудочную секрецию в условиях многокомпонентного стрес-

са, формируя одинаковый уровень секреторной активности органа у всех животных вне зависимости от сочетания и последовательности стрессогенных воздействий.

3. Пептид выявил границы нормы реакции разных показателей желудочной секреции у крыс.

## ЛИТЕРАТУРА

1. З. В. Бакаева, И. Г. Козлов, А. Д. Сангаджиева и др., *Докл. АН*, **465**(5), 612 (2015).
2. А. Н. Батырова, Г. С. Бердалина, *Вестник КазНМУ*, **2**(2), 24 – 25 (2014).
3. М. Ш. Вайнштейн, *Язвенная болезнь желудка как частный случай дезадаптации*, Новосибирск (1977).
4. М. Н. Макарова, А. В. Рыбакова, Я. А. Гушин и др., *Международный вестник ветеринарии*, № 1, 82 – 104 (2016).
5. Ф. З. Меерсон, М. Г. Пшеникова, *Адаптация к стрессорным ситуациям и физическим нагрузкам*, Медицина, Москва (1988).
6. В. Г. Мыш, *Секреторная функция желудка и язвенная болезнь*, Наука, Новосибирск (1987).
7. *Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях*, Н. Н. Каркищенко, С. В. Грачев (ред.), Москва (2010).
8. Г. Е. Самонина, Г. Н. Копылова, В. И. Сергеев и др., *Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова*, **87**(11), 1488 – 1492 (2001).
9. Г. Селье, *Стресс без дистресса*, Прогресс, Москва (1979).
10. Т. А. Томова, Е. Ю. Просекина, Т. А. Замощина и др., *Вестник ТГУ. Биология*, **1**(25), 183 – 198 (2014).
11. А. М. Уголев, *Исследование пищеварительного аппарата у человека*, Наука, Ленинград (1969).
12. А. А. Ухтомский, *Доминанта*, Наука, Москва, Ленинград (1966).
13. E. Aihara, K. A. Engevik, M. H. Montrose, *Annu Rev. Physiol.*, № 79, 357 – 380 (2017).
14. M. A. Aller, J. I. Arias, J. Arias, *Theor. Biol. Med. Model.*, № 7, 37 (2010).
15. L. D. Godoy, M. T. Rossignoli, P. Delfino-Pereira, et al., *Front Behav Neurosci*, № 12, 127 (2018).
16. R. H. Hunt, M. Camilleri, S. E. Crowe, et al., *Gut*, **64**(10), 1650 – 1668 (2015).
17. J. Kan, M. Hood, C. Burns, et al., *Nutrients*, **9**(9), 978 (2017).
18. G. Perez-Nievas Beatriz, B. Garcia-Bueno, L. M. Madrigal Jose, C. Leza Juan, *J. Neuroinflammation*, № 7, 60 (2010).
19. L. Van Oudenhove, M. D. Crowell, D. A. Drossman, *Gastroenterology*, **150**(6), 1355 – 1367 (2016).

Поступила 25.05.18

## THE INFLUENCE OF GLYCYLPROLINE (GLY-PRO) PEPTIDE ON THE CARBACHOL-STIMULATED SECRETORY ACTIVITY OF STOMACH UNDER MULTICOMPONENT STRESS CONDITIONS

T. A. Tomova<sup>1</sup>, T. A. Zamoshchina<sup>2</sup>, and M. V. Svetlik<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Tomsk State Pedagogical University, ul. Kievskaya 60, Tomsk, 634061 Russia;

<sup>2</sup> Siberian State Medical University, Moskovskii tract 2, Tomsk, 634050 Russia

The influence of glycylproline (Gly-Pro) peptide on the carbachol-stimulated secretory activity of the stomach under of multicomponent stress conditions was studied in experiments on rats. The effects of stress factors (immobilization, surgical intervention, and injection procedure) in various combinations and sequences was accompanied by the formation of three types of stomach response to cholinergic stimulation of gastric secretion: normal, hypoergic, and hyperergic. Gly-Pro modulated the cholinergic effects on gastric secretion in a multicomponent stress environment, forming a normalergic level of stomach activity in all animals. In addition, the peptide revealed the limits of the reaction rate of various indicators of gastric secretion in rats.

**Keywords:** glycylproline peptide; Gly-Pro; multicomponent stress; carbachol; gastric secretion.