На правах рукописи

ТОМОВА ТАТЬЯНА АЛЕКСАНДРОВНА

ВЛИЯНИЕ ПЕПТИДА ГЛИЦИЛ-ПРОЛИНА НА СЕКРЕТОРНУЮ ФУНКЦИЮ ЖЕЛУДКА ПРИ ИММОБИЛИЗАЦИОННОМ СТРЕССЕ

03.00.13 – физиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени

кандидата биологических наук

Томск – 2006

Работа выполнена на кафедре физиологии человека и животных Томского государственного университета

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор **Гриднева Вера Ивановна**

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор **Васильев Владимир Николаевич**

кандидат биологических наук, с.н.с. **Ласукова Татьяна Викторовна**

Ведущая организация

ГУ НИИ фармакологии Томского научного центра СО РАМН

Защита состоится 30 марта 2006 г. в 10 часов на заседании диссертационного совета Д 212.267.10 при Томском государственном университете (634050, г. Томск, Ленина, 36).

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке Томского государственного университета (634050, г. Томск, пр. Ленина, 34).

Автореферат разослан «28» февраля 2006 г.

Учёный секретарь

диссертационного совета _____/ Е.Ю. Просекина /

Актуальность проблемы. Изменения моторной и секреторной функций желудочно-кишечного тракта, по современным представлениям, являются обязательным компонентом реакции организма на стрессорное воздействие (Гуска Н.И., 1990; Перцов С.С., 1995; Пшенникова М.Г., 1999; Фурдуй Ф.И., 1990; Martinez-Augustin O., Sanches de Medina F.Jr., Sanches de Medina F., 2000). Ещё Г. Селье избрал эту систему одним из индикаторов стресса, а желудок – одним из его главных органов–мишеней. Стрессорные реакции желудка являются необходимым условием приспособления организма к изменениям в окружающей среде (Селье Г., 1960).

В настоящее время известно, что в формировании компенсаторно-приспособительных реакций со стороны желудочно-кишечного тракта в ответ на стресс и нарушение гомеостаза участвуют такие регуляторные пептиды, как энкефалины, эндорфины, серотонин, дофамин, АКТГ (Георгадзе А.К. и др., 1990; Жукова Т.В. и др., 1994; Зверков И.В. и др., 1987; Корякина Л.А., Серова Л.И., 1989; Павлова В.И., 1990; Просекина Е.Ю., 2001; Тимошин С.С., и др., 1990; Циммерман Я.С., Ведерников В.Е., 1998; Beaulieu S., Paolo T., Barden N., 1985; Mehta C.S., Strada S.J., 1994; Nigel W. Bunnett, 2005). Активное изучение регуляторных пептидов привело к радикальному переосмыслению механизмов регуляции гомеостаза (Хавинсон В.Х., Малинин В.В., 2002). Выяснилось, что во многих случаях воздействие на физиологические процессы оказывают не целые молекулы, а их небольшие фрагменты – олигопептиды (Морозов В.Г. и др., 2000; Хавинсон В.Х., Малинин В.В., 2002). В этом аспекте большой интерес представляют малоизученные пептиды, которые были выявлены сравнительно недавно - глипролины (Ашмарин И.П. и др., 1998, 2002; Бакаева З.В. и др., 2004). К настоящему моменту, к семейству глипролинов относят Pro-Gly (PG), Gly-Pro (GP), Pro-Gly-Pro (PGP), Gly-Pro-Gly-Gly (GPGG) и некоторые другие пептиды (Ашмарин И.П. и др., 1998, 2002). Пролинсодержащие пептиды обладают уникальным спектром физиологической активности: влияют на анальгетические реакции (Абрамова М.А. и др.,1997; Ray A.K., Dey P.K., 1982), изменяют удельную активность ферментов утилизации нейромедиаторов (Доведова

Е.Л. и др., 1998), модулируют активность самих медиаторов (Бабская Н.Е., Ашмарин И.П., 1998), усиливают лимфоток брыжейки крыс, препятствуют развитию стрессогенных нарушений микроциркуляции русла брыжейки крыс (Жуйкова С.Е., 2003; Смирнова Е.А., 2004), изменяют поведение крыс, вызванное воздействием стресса (Копылова Г.Н. и др., 2004). PGP, PG, GP обладают эффективным протекторным и лечебным противоязвенным действием (Абрамова М.А. и др., 1996; Ашмарин И.П. и др., 2002; Бакаева З.В., Самонина Г.Е., 2005; Samonina G. et al., 2000).

Анализ литературы показал малочисленность и неоднозначность имеющихся данных о протекторном действии пролинсодержащих пептидов на слизистую оболочку желудка. Отсутствует информация о влиянии глипролинов на комплекс показателей желудочной секреции в условиях стимуляции деятельности желудка при стрессе. Крайне малочисленна информация об участии пролинсодержащих пептидов в защитных реакциях желудка. Отсутствуют данные о регуляции этими пептидами секреции слизи. Вплоть до настоящего времени не до конца изучены механизмы действия глипролинов и многие вопросы остаются открытыми. Не рассматривались особенности влияния дипептидных дериватов, которые образуются при гидролизе PGP и GPGG под действием пролилпептидаз, на секреторную активность желудка. Не изучался вопрос о возможности глипролинов модулировать эффекты парасимпатической и сипматической нервных систем. Поэтому выше сказанное объясняет интерес данной научной работы к изучению действия пролинсодержащих пептидов на секреторную функцию желудка, стимулированную карбахолином, в условиях иммобилизационного стресса (ИС).

Цель исследования: изучить влияние дипептида GP на секреторную активность желудка при ИС.

Для достижения цели последовательно решались следующие **задачи:**

1. Оценить особенности действия пролинсодержащих пептидов PGP и GP на секреторную активность желудка крыс и собак на фоне действия карбахолина.

2. Изучить влияние временного интервала между введением физиологического раствора и карбахолина на секрецию желудка крыс после ИС.

3. Исследовать особенности влияния ИС на желудочную секрецию собак с исходно различными уровнями секреторной активности желудка.

4. Изучить особенности действия пептидов PGP, GP на секреторную активность желудка при иммобилизации и определить их зависимость от реакции желудка на стрессорное воздействие и режима дозирования пептида.

Научная новизна и практическая значимость. В работе впервые проведён анализ действия пролинсодержащих пептидов (PGP, GP) на секреторную активность желудка, стимулированную карбахолином с использованием модели ИС. Показано, что характер ответа сочетанного действия пептидов PGP и GP с карбахолином и антистрессорная активность этих глипролинов в отношении слизистой оболочки желудка (СОЖ) определялись: 1) структурной формой глипролинов, 2) интервалом времени между введением стимулятора и пептида, 3) исходным уровнем секреторной активности желудка, 4) моментом введения пептида относительно действия ИС. Впервые установлено, что временной интервал между введением физиологического раствора и карбахолина после ИС приводит к разным проявлениям стресс–реакции у крыс со стороны секреции желудка. Кроме того, отличия в реакции на стресс были зарегистрированы у собак с различными исходными уровнями желудочной секреции. Впервые обнаружены способности пептидов PGP и GP изменять концентрацию кортикостероидов в крови животных, что может являться одним из возможных механизмов обеспечения глипролинами адаптивных реакций со стороны желудка в ответ на действие стресса. Данная работа вносит вклад в развитие представлений о механизмах пептидергической регуляции секреторной функции желудка в физиологических условиях и при действии стресса. Результаты работы раскрывают и расширяют представление о роли системы пептидных регуляторов в механизмах адаптации СОЖ к стрессорному воздействию и располагают к поиску лекарственных средств на основе данных пептидов. Основные положения работы могут быть использованы в качестве теоретической основы для при-

кладных исследований в научно – практических учреждениях, занимающихся проблемами профилактики и коррекции функционального состояния организма при воздействии на него длительной иммобилизации.

Результаты исследований используются в теоретических курсах «Трофология», «Эндокринология», «Основы межклеточной и внутриклеточной сигнализации», «Регуляторные пептиды», «Физиология человека и животных», читаемых на кафедре физиологии человека и животных Томского госуниверситета.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Пролинсодержащие пептиды могут модулировать холинергические влияния на желудочную секрецию в нормальных физиологических условиях и в условиях ИС.

2. Дипептид GP – структурный компонент PGP, обладает самостоятельной физиологической активностью в отношении желудочной секреции по сравнению со своим предшественником. Его эффект зависит от временного интервала между инъекциями дипептида и карбахолина, исходного уровня секреции желудка, направленности изменения секреции желудка под действием стресса и режима дозирования пептида.

Апробация работы. Основные положения диссертации докладывались на научных съёздах и конференциях: «Физиология организмов в нормальном и экстремальном состояниях» (Томск, 2001), IV съезд Физиологов Сибири (Новосибирск, 2002), «Старт в науку» (Томск, 2002), «Биолого-почвенный факультет: прошлое, настоящее и будущее» (Томск, 2003), XIX съезд физиологического общества им. И.П. Павлова (Екатеринбург, 2004), V Сибирский физиологический съезд (Томск, 2005).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 8 работ, из которых 5 работ в рецензируемых журналах.

Объём и структура работы. Диссертация изложена на 159 страницах машинописного текста и состоит из списка сокращений, введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов собственных

исследований и их обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы, включающего 253 отечественных и 83 зарубежных источников. Работа иллюстрирована 17 рисунками и 16 таблицами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.

Острый эксперимент был выполнен на 80 крысах – самцах, линии Вистар, массой 180 – 240 г, выращенные в питомнике “Рассвет” объединения “Вирион”. Для сбора желудочного сока всех животных подвергали операции по наложению лигатур на пилорический отдел желудка. За 24 часа до начала операции животных лишали пищи. Операцию проводили под кратковременным эфирным наркозом, и после завершения через 90 минут крысам вводили пептиды и стимулятор желудочной секреции. По окончании времени секреции, крыс декапитировали, извлекали желудок и содержимое подвергали анализу. **Хронический эксперимент** был выполнен на 7 беспородных собак – самцах, массой 16 – 22 кг, оперированных под нембуталовым наркозом с образованием фистулы желудка по Басову (Лопухин Ю.М., 1971). Эксперимент начинали через 30 дней после операции. **Стимуляцию желудочного сокоотделения** осуществляли внутримышечным введением карбахолина (“Reanal”, Венгрия), запускающего процесс желудочно-кишечной секреции, крысам в дозе 25 мкг/кг, собакам – в дозе 6 мкг/кг (Кузнецов А.П., 1985; Смелышева Л.Н., 1994). Вызванная секреция у крыс продолжалась 45 минут, являясь оптимальным промежутком времени для получения объёма секрета соответствующего объёму желудка (Бесядовский Р.А., 1978). Вызванная секреция у собак продолжалась 2,5 часа с момента введения стимулятора желудочной секреции, сок собирали 30 – минутными пробами, что давало возможность оценить влияние пептида на динамику желудочной секреции. **Использовали пептиды** PGP (производства лаборатории регуляторных пептидов Института Молекулярной Генетики РАН, Москва) и GP (производства “Senn Chemicals”, Schweiz). PGP в дозе 1 мг/кг, GP в дозе 1 мг/кг крысам вводили внутрибрюшинно в объёме 1 мл на 200 г массы животного. Собакам GP вводили внутривенно в дозе 70 мкг/кг. **Модель стрес-**

са. При изучении реакций желудка в экстремальных условиях в качестве стрессора применяли апробированную Г. Селье (1936) модель, ставшую классической, нервно-мышечного напряжения – иммобилизация в течение определённого промежутка времени однократно (Селье Г., 1979). Иммобилизацию крыс осуществляли фиксацией животного за конечности на операционном столике на спине в течение 18 часов. ИС у собак создавали помещением животных на 18 часов в узкие клетки из деревянных реек, максимально ограничивающие их движение. **Оценку интенсивности стресс – реакции** осуществляли с помощью таких критериев, как изменение уровня кортикостероидов в плазме крови флуориметрическим методом (Панков Ю.А., Усватова И.Я., 1965), а также содержания общего числа лейкоцитов и их отдельных морфологических форм в периферической крови животных (Горизонтов П.Д. и др., 1983; Гольдберг Е.Д. и др., 1990; 1996). **О секреторной функции** судили по объёму желудочного сока, активности H^+ (Канищев П.А., Коваленко Л.Г., 1977), темпу секреции активных H^+ (Мыш В.Г., 1987), протеолитической активности желудочного сока (метод Ансона и Мирского в модификации А.М. Уголева, 1969) и фукозе, количество которой является маркером для оценки слизеобразующей функции желудка (Гребенёв А.Л. и др.; Коротько Г.Ф., 1971; Dicshe N., Shettles L., 1948).

Крыс как модельный объект использовали в следующих сериях опытов:

1. Контроль - исследовали желудочную секрецию при введении физиологического раствора и карбахолина (n = 14).

2. Исследовали желудочную секрецию при введении PGP одновременно с карбахолином (n = 10). Эффект пептида регистрировали через 45 минут

3. Исследовали желудочную секрецию при введении GP одновременно с карбахолином (n = 10), где через 45 минут регистрировали эффект пептида.

4. Исследовали желудочную секрецию при введении GP за 30 минут до карбахолина (n = 10), где регистрировали эффект пептида через 75 минут с момента его введения.

5. Исследовали желудочную секрецию при введении физиологического раствора одновременно с карбахолином после иммобилизации (n = 8).

6. Исследовали желудочную секрецию при введении физиологического раствора за 30 минут до карбахолина после иммобилизации (n = 7).

7. Исследовали желудочную секрецию при введении PGP одновременно с карбахолином после ИС (n = 8). Эффект пептида регистрировали через 45 минут с момента его введения.

8. Исследовали желудочную секрецию при введении GP одновременно с карбахолином после ИС (n = 7). Эффект пептида регистрировали через 45 минут с момента его введения.

9. Исследовали желудочную секрецию при введении GP за 30 минут до карбахолина после ИС (n = 7). Эффект пептида регистрировали через 75 минут с момента его введения.

Собак как модельный объект использовали в следующих сериях опытов:

1. Контроль - исследовали желудочную секрецию при введении физиологического раствора и карбахолина (n = 38).

2. Исследовали желудочную секрецию при одновременном введении GP с карбахолином (n = 29). Эффект пептида регистрировали 2,5 часа.

3. Исследовали стимулированную карбахолином желудочную секрецию при введении физиологического раствора собакам после и до ИС (n = 34).

4. Исследовали одновременное введение GP с карбахолином после ИС (n = 28). Эффект пептида регистрировали 2,5 часа.

5. Исследовали желудочную секрецию при введении GP до воздействия ИС (n = 28). Эффект пептида регистрировали по истечению 20 часов с момента его введения в течение 2,5 часов.

Всего в рамках данной работы выполнено 14 серий экспериментов, поставлено 80 опытов в остром эксперименте и 150 хронических опытов, проведён анализ более 4,5 тысяч проб.

Статистические процедуры проводились с помощью прикладного пакета STATISTICA 5.5. Вычислялись среднее значение анализируемого показателя (M), стандартная ошибка среднего (m) и критерий значимости, относительно которого определялся достигаемый уровень значимости (p). Статистический

анализ достоверности различий между выборками проводили с использованием критерия Mann-Whitney U test и критерия Стьюдента (t). Значимыми считались различия при $p < 0,05$ (Лакин Г.Ф., 1990).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЯ

Предположения о вероятной модуляции пролинсодержащими пептидами холинергических влияний, высказываемые Н.Е. Бабской, И.П. Ашмариным (1998) определили использование в работе в качестве стимулятора секреции желудка синтетического аналога ацетилхолина – карбахолина.

Введение PGP на фоне действия карбахолина вызывало увеличение объёма желудочного сока на 59 %, темпа секреции H^+ практически в 2,5 раза, протеолитической активности в 5 раз и количества фукозы на 123 % ($p<0,05$) в желудочном секрете крыс (рис. 1). При введении в организм PGP, часть его остается неизменной в течение длительного времени (5 часов), а часть деградирует на метаболиты PG и GP (Ашмарин И.П. и др., 1998; Золотарев Ю.А. и др., 2003). Введение GP на фоне карбахолина не изменяло объем желудочного сока, темп секреции H^+, вместе с тем, снижало концентрацию H^+ на 36 %, увеличивало протеолитическую активность желудочного сока в 3 раза и уменьшало количество фукозы на 27 % ($p<0,05$). Таким образом, дипептид GP обладает самостоятельной физиологической активностью по сравнению со своим предшественником PGP в отношении стимулированной желудочной секреции.

Известно, что GP обнаруживает свою активность по истечению 60-ти, 90-та минут опыта после его введения (Самонина Г.Е. и др., 2001) и достаточно долго существует в плазме крови (Золотарев Ю.А. и др., 2003), поэтому представилось интересным рассмотреть эффективность действия GP на стимулированную желудочную секрецию, увеличив время регистрации эффекта пептида. Дипептид вводили за 30 минут до инъекции стимулятора, что давало возможность продлить время регистрации эффекта пептида до 75 минут и сохранить время желудочной секреции (45 минут), по истечению которого получали оптимальный объём желудочного сока (Бесядовский Р.А. и др., 1978).

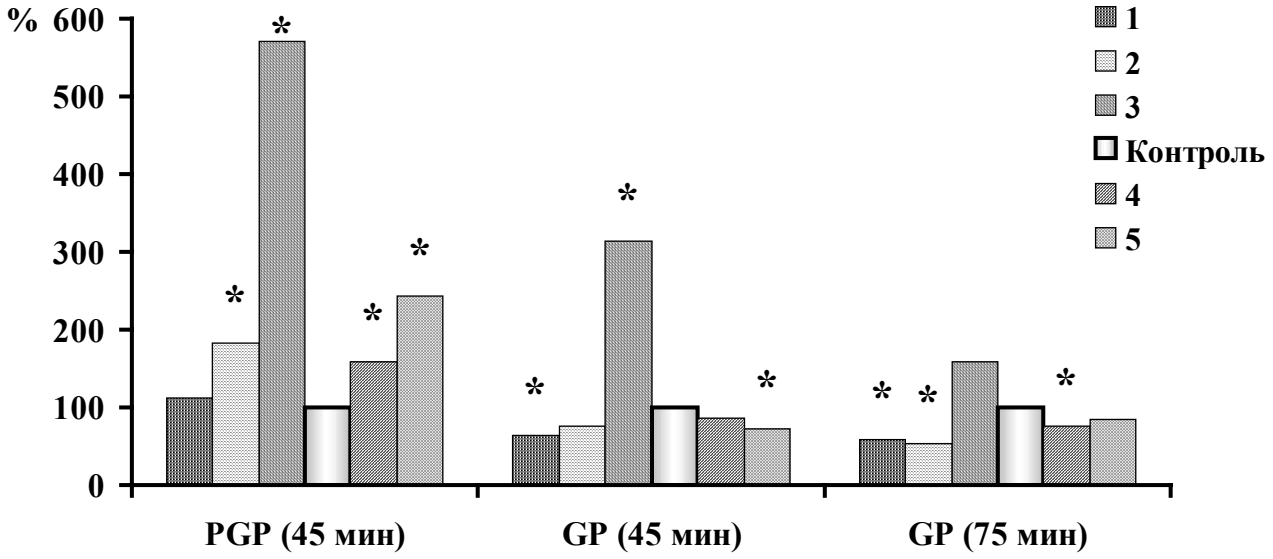

Рис. 1 Влияние пептидов PGP и GP на секреторную функцию желудка крыс, стимулированную карбахолином

Примечания: 1 – активность H^+; 2 – темп секреции H^+; 3 – протеолитическая активность; 4 – объём желудочного сока; 5 – содержание фукозы; * - отличия относительно контроля значимы при $p<0,05$.

При введении GP за 30 минут до инъекции карбахолина наблюдали снижение объёма желудочного секрета на 24 %, кислотности на 41 % и темпа секреции H^+ в 2 раза ($p<0,05$) в желудочном секрете крыс (рис. 1). Таким образом, эффект полученный на 75 минуте регистрации действия пептида отличен от того, который был получен на 45 минуте.

Для подтверждения возможных особенностей изменения желудочной секреции во времени регистрации эффекта GP дальнейшим этапом в исследованиях было рассмотрение влияния пептида на секреторную активность желудка собак в динамике соковыделения, исключив временной фактор в сочетаниях инъекций GP и карбахолина.

В контрольных опытах у собак была обнаружена значительная вариабельность показателей секреторной активности желудка, что позволило разделить животных на две группы. Для собак первой группы характерна высокая секреторная активность желудка, что проявилось в значительном объёме желудочного сока с высоким темпом секреции H^+, протеолитической активностью и со-

держанием фукозы в желудочном секрете. Во вторую группу отнесены животные со сниженной секреторной активностью желудка и соответственно с низкими значениями показателей секреции по сравнению с первой группой (табл. 1). Результаты анализа желудочного содержимого в контрольных группах животных сопоставимы с результатами в работах В.И. Гридневой (2004), А.Н. Иордан (1998), Н.А Кривовой с соавт. (2002), Е.Ю. Просекиной (2001), Т.А. Сошниковой (2001), Ярымовой И.А. (2003), K. Somarumdaram (1985). Различия между группами в характере секреторного ответа на введение стимулятора карбахолина являются отражением «индивидуальной нормы» (Гриднева В.И., 2004), что обусловлено конституциональными особенностями гуморальной регуляции и структуры желудочных желез (Дорофеев Г.И., Успенский В.М., 1984; Успенский В.М., 1981, 1982).

Таблица 1

Контрольные показатели секреторной активности желудка у собак

Показатели	Первая группа собак с исходно высокой секрецией желудка, M ± m (n = 23)	Вторая группа собак с исходно низкой секрецией желудка, M ± m (n = 15)
Суммарный объём секрета, мл	98,9 ± 7,34	70,5 ± 7,53 *
Концентрация H^+, мкмоль/мл	65,1 ± 5,86	64,2 ± 2,74
Темп секреции H^+, ммоль/2,5ч	7,9 ± 1,13	3,8 ± 0,37 *
Пептическая активность, ммоль	7,6 ± 1,71	0,7 ± 0,15 *
Содержание фукозы, мкмоль	22,4 ± 4,06	10,5 ± 1,72 *

Примечания

1 N – объем выборки, соответствующий количеству опытов

2 M ± m - среднее ± стандартная ошибка среднего

3 *-отличие относительно первой группы статистически значимо ($p<0,05$)

Изменения показателей секреторной функции желудка собак после введения дипептида определялись исходным уровнем секреторной активности органа животных. У собак с исходно высокой секреторной активностью желудка

введение GP на фоне карбахолина вызывало лишь увеличение объёма желудочного сока на 80 % (рис. 2). Тогда как, у собак с исходно низкой секреторной активностью желудка пептид в сочетании с карбахолином увеличивал объём желудочного сока на 33 %, протеолитическую активность на 171 % и содержание фукозы на 49 %, но уменьшал концентрацию H^+ на 15 % ($p<0,05$).

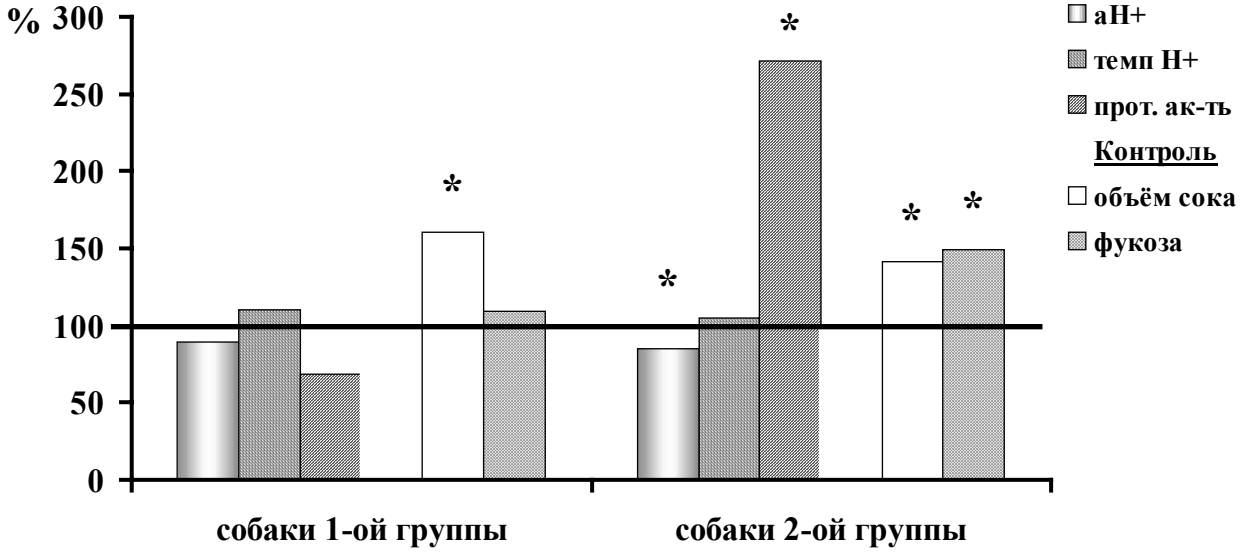

Рис. 2 Влияние пептида GP на секреторную функцию желудка у собак с исходно различными уровнями желудочной секреции, стимулированной карбахолином

Примечания: 1 и 2 группы – собаки с исходно высокой и низкой секреторной активностью желудка соответственно; * - отличия относительно контроля значимы при $p<0,05$.

При введении GP в динамике соковыделения отмечены изменения на протяжении всего эксперимента (2,5 часа), что можно продемонстрировать на примере протеолитической активности желудочного сока у собак с исходно низкой секреторной активностью желудка (рис. 3А). Необходимо отметить, что у собак этой группы GP вызывал как увеличение на 30 минуте опыта темпа секреции H^+, так и его уменьшение на 90 минуте эксперимента (рис. 3Б). Данный факт можно считать доказательством в пользу неоднозначности влияния дипептида на изменение продукции соляной кислоты в динамике наблюдения эффекта GP. Сохранение эффекта на 90 минуте, хотя и противоположного первой пробе, по-

видимому, как упоминалось уже в работе С.Е. Жуйковой (2003), говорит о возможном запуске каскадных реакций. Вдобавок, такое отсроченное действие GP (во много раз больше продолжительности жизни любого пептида) может быть обусловлено синтезом собственных пептидов.

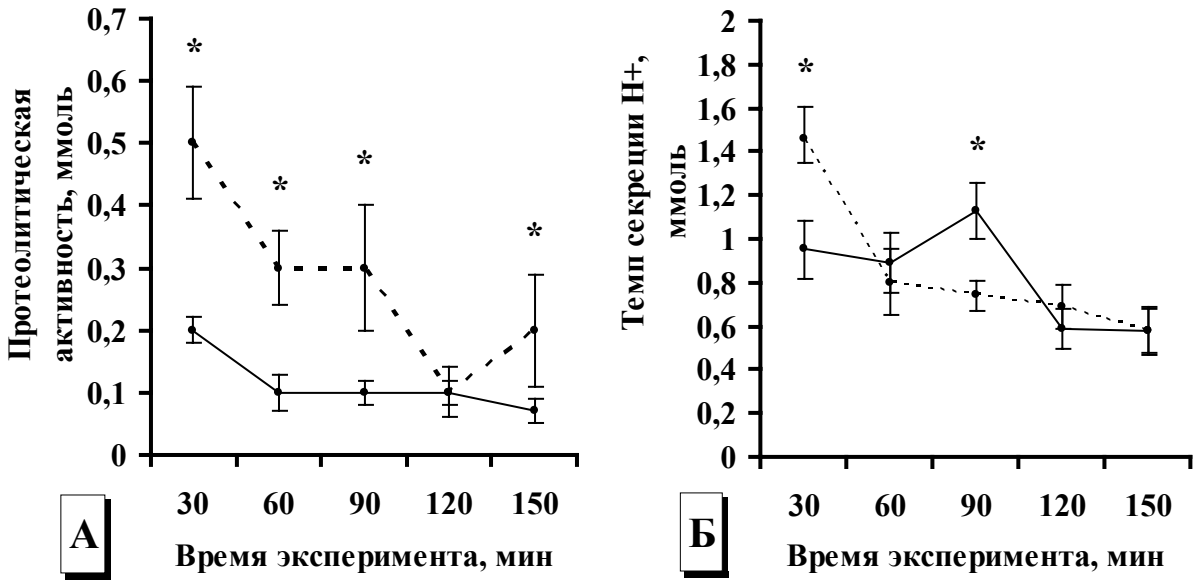

Рис. 3 Изменения протеолитической активности (А) и темпа секреции водородных ионов (Б) в динамике у собак с исходно низкой секреторной активностью желудка после введения GP

Примечания: сплошная линия – карбахолин+физиологический раствор, пунктирная - карбахолин+GP; * - отличия относительно контроля значимы при $p<0,05$.

Согласно литературным данным пролинсодержащие пептиды проявляют неоднозначное противоязвенное действие в отношении повреждений СОЖ, обусловленных центральными (стрессорная модель язвообразования) или периферическими (этаноловая и индометациновая модели) механизмами (Абрамова М.А. и др., 1998). GP оказывает протекторный эффект лишь при стрессорной модели язвообразования (Абрамова М.А. и др., 1998; Золотарев Ю.А. и др., 2003).

Используемая в эксперименте модель длительного (18 часов) и непрерывного ИС является многокомпонентным стрессирующим фактором (Судаков

К.В., 1988; Скурихин Е.Г., 1997). Контроль, за степенью стрессированности животных показал, что применяемая модель ИС вызывала изменение уровня катаболических гормонов, которое определялось временем введения физиологического раствора относительно карбахолина у крыс и исходным уровнем гормонов у собак.

При введении крысам, претерпевшим ИС, физиологического раствора на фоне карбахолина зарегистрировали уменьшение концентрации кортикостерона в плазме крови (с (0,5 ± 0,02) мкмоль/л до (0,2 ± 0,005) мкмоль/л, $p<0,05$), а при введении физиологического раствора за 30 минут до карбахолина отметили увеличение концентрации гормона (с (0,5 ± 0,02) мкмоль/л до (0,8 ± 0,10) мкмоль/л, $p<0,05$). У собак с исходно низкой концентрацией глюкокортикоидов после ИС содержание гормонов увеличилось в 4,3 раза (с (0,3 ± 0,04) мкмоль/л до (1,2 ± 0,04) мкмоль/л, $p<0,05$). Тогда как, у собак с исходно высокой концентрацией катаболических гормонов иммобилизация вызывала увеличение кортикостероидов в 2,5 раза (с (0,6 ± 0,08) мкмоль/л до (1,6 ± 0,08) мкмоль/л, $p<0,05$). У крыс и собак уровень концентрации кортикостероидов в плазме крови контрольных опытов соответствовал видовой норме (Бесядовский Р.А. и др., 1978; Горизонтов П.Д. и др., 1983). Среди признаков характеризующих стресс–реакцию в работе отмечены выраженный нейтрофильный лейкоцитоз (за счёт сегментоядерных форм у крыс, собак первой группы и палочкоядерных форм у второй группы собак), эозинопения и лимфопения. Из всех морфологических форм лейкоцитов число лимфоцитов составило менее 20 % у экспериментальных животных, что, по мнению Л.Х. Гаркави с соавт. (1998), характерно для реакции типа стресс и отличает её от реакции активации и тренировки. Суммарное количество лейкоцитов у крыс после ИС увеличивалось в 3,5 раза при введении физиологического раствора одновременно с карбахолином (с (3579 ± 168)$\times 10^9$/л до (12840 ± 826)$\times 10^9$/л, $p<0,05$) и в 2,5 раза при введении физиологического раствора за 30 минут до стимулятора секреции желудка (с (3579 ± 168)$\times 10^9$/л до (8694 ± 835)$\times 10^9$/л, $p<0,05$). Суммарное количество лейкоцитов у

собак обеих групп после иммобилизации увеличилось на 95% (с (10061 ± 577,0)×10^9/л до (19617 ± 570,0) ×10^9/л, $p<0,05$).

Таким образом, используемая модель ИС вызывала изменения уровня кортикостероидов, количества лейкоцитов и их морфологических форм в периферической крови, соответствующие комплексу реакций, описанных в работах А.А. Виру (1981), П.Д. Горизонтова (1983), П.П. Голикова (1988), Е.Д. Гольдберга (1990; 1996), Л.А. Колесниковой и И.Н. Оськиной (2003), Т.В. Ласуковой (1991), Ю.Б. Лишманова, Л.Н. Маслова (1994), А.И. Робу (1982). Зависимость величины и направленности наблюдаемых изменений картины крови от инъекций физиологического раствора, а также индивидуальных характеристик после ИС находит подтверждение в работах Т.А. Замощиной (1997), Н.К. Поповой и др. (1996), Л.А. Колесниковой, И.Н. Оськиной (2003), Bohus et al. (1993), L. Conti and S. Foote (1995). По всей вероятности это связано с исходно различной функциональной активностью гипофизарно-надпочечниковой системы животных.

Наряду с неоднозначными изменениями показателей системы крови в данных экспериментах были обнаружены и разнонаправленные изменения в секреторной активности желудка, как у крыс, так и у собак после действия стресса. Угнетение секреторных процессов желудка наблюдали у крыс, которым вводили физиологический раствор одновременно с карбахолином после ИС: снижались объём желудочного сока, кислотность и темп секреции H^+ (табл. 2). У собак с исходно высокой секреторной активностью желудка иммобилизация также вызывала значимое снижение объема секрета, кислотности желудочного сока и протеолитической активности (табл. 3). Напротив, повышение объёма желудочного сока, темпа секреции H^+, протеолитической активности и содержания фукозы регистрировали у крыс, которым вводили физиологический раствор за 30 минут до карбахолина после ИС (табл. 2). У собак с исходно низкой секреторной активностью желудка стресс стимулировал кислотно-пептический фактор и образование фукозы (табл. 3).

Таблица 2

Влияние иммобилизации на секреторную активность желудка крыс

Показатели секреции желудка	Контроль – введение ФР и карбахолина, M ± m (n = 14)	Стресс 1 - введение ФР одновременно с карбахолином после ИС, M ± m (n = 8)	Стресс 2 - введение ФР за 30 минут до карбахолина после ИС, M ± m (n = 7)
Объём желудочного сока, мл	4,6 ± 0,33	2,5 ± 0,27 *	7,4 ± 0,58 * $^{××}$
Концентрация H^+, мкмоль/мл	62,2 ± 3,91	2,4 ± 2,20 *	64,7 ± 8,27 $^{××}$
Темп секреции H^+, мкмоль/45 мин	269,2 ± 39,17	2,5 ± 0,27 *	485,9 ± 89,84 * $^{××}$
Протеолитическая активность, мкмоль	90,9 ± 16,40	81,7 ± 13,76	582,7 ± 96,09 * $^{××}$
Содержание фукозы, мкмоль	4,4 ± 0,44	5,1 ± 0,69	9,5 ± 0,69 * $^{××}$

Примечания

1 ФР – физиологический раствор

2 ИС – иммобилизационный стресс

3 N – объем выборки, соответствующий количеству опытов

4 M ± m - среднее ± стандартная ошибка среднего

5 * - отличие относительно контроля статистически значимо при $p < 0,05$

6 $^{××}$ - отличие относительно серии стресс 1 статистически значимо при $p < 0,05$

Полученные данные свидетельствуют о том, что ИС вызывал у крыс и собак дифференцированные по характеру реакции со стороны секреторной активности желудка. Основываясь на данных литературы, можно предположить, что разнонаправленные эффекты на действие стресса у крыс и собак говорят о качественно различных состояниях животных после иммобилизации. Подтверждением чему, по мнению Л.Х. Гаркави с соавт. (1998), служит и разная сте-

пень повышения или снижения показателей системы крови (концентрация кортикостероидов, лейкограмма).

Таблица 3

Изменения желудочной секреции у собак с разными исходными уровнями секреторной активности желудка после ИС

Показатели желудочной секреции	Уровень секреции	Контроль – введение ФР и карбахолина, M ± m (n^1 = 23, n^2 = 15)	Введение ФР и карбахолина после ИС, M ± m (n^1 = 19, n^2 = 15)
Суммарный объём сока, мл	Высокий	98,8 ± 7,33	68,9 ± 9,27 *
	Низкий	70,5 ± 7,53	86,1 ± 7,71
Концентрация H^+, мкмоль/мл	Высокий	65,1 ± 5,86	43,7 ± 6,39 *
	Низкий	64,2 ± 2,74	83,6 ± 2,76 *
Темп секреции H^+, ммоль/2,5 часа	Высокий	7,9 ± 1,13	5,4 ± 0,78
	Низкий	4,1 ± 0,47	5,6 ± 0,77
Протеолитическая активность сока, ммоль	Высокий	7,6 ± 1,71	1,7 ± 0,26 *
	Низкий	0,7 ± 0,15	1,5 ± 0,29 *
Содержание фукозы, мкмоль	Высокий	22,4 ± 4,06	18,0 ± 4,26
	Низкий	10,5 ± 1,72	17,9 ± 3,11 *

Примечания

1 ФР – физиологический раствор

2 N^1, n^2 – количество опытов в группах у собак с исходно высоким и низким уровнями желудочной секреции соответственно

3 M ± m - среднее ± стандартная ошибка среднего

4 * - отличие относительно контроля статистически значимо при $p < 0,05$

В ходе выяснения действия пролинсодержащих пептидов PGP и GP на секреторную активность желудка, качественно различную у экспериментальных животных после иммобилизации, отмечен ряд интересных особенностей. Введение PGP одновременно с карбахолином крысам после иммобилизации увеличивало объём желудочного сока, концентрацию и темп секреции H^+, которые были снижены действием стресса. Кроме того, повышалась протеолити-

ческая активность желудочного сока, и увеличивалось содержание фукозы в желудочном секрете (рис. 4).

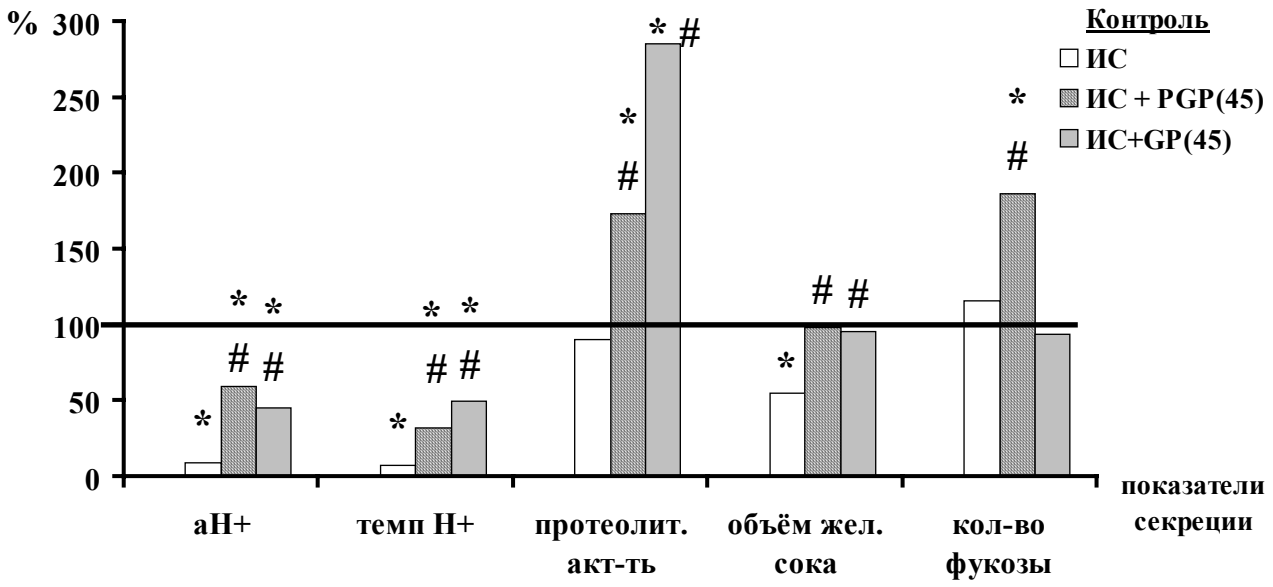

Рис. 4 Влияние введения PGP и GP на фоне карбахолина после ИС на желудочную секрецию крыс

Примечания: 1 – активность H^+; 2 – темп секреции H^+; 3 – протеолитическая активность; 4 – объём желудочного сока; 5 – содержание фукозы; *, # - отличия относительно контроля и серии «ИС» значимы при $p<0,05$.

Введение пептида GP одновременно с карбахолином после ИС усиливало ферментативную активность желудочного сока наряду с увеличением объёма секрета, кислотности и темпа секреции H^+, сниженных действием стресса (рис. 4). Отличия в эффектах пептидов PGP и GP заключались в том, что увеличение темпа секреции H^+, которое было снижено действием ИС, под влиянием GP было значительно выше (значение показателя ближе к контрольному значению), чем при использовании PGP, а изменения содержания фукозы после введения GP не происходило. Действие пептидов PGP и GP было противоположным направленности действия иммобилизации: объем желудочного секрета восстанавливался, кислотность и темп секреции H^+ росли, но были значимо ниже контрольных значений. Однако, протеолитическая активность при введе-

нии пептидов PGP и GP крысам после ИС значимо превосходила как значения серии «ИС», так и контрольные значения.

Введение GP за 30 минут до карбахолина крысам, подвергнутым иммобилизации вызывало уменьшение объёма желудочного секрета, концентрации и темпа секреции H^+, протеолитической активности сока, которые были увеличены действием стресса (рис. 5). Сниженные влиянием пептида величины концентрации H^+ и темпа их секреции оказались примерно в 2 раза меньше величин контрольных значений, тогда как протеолитическая активность значимо превышала уровень исходной активности.

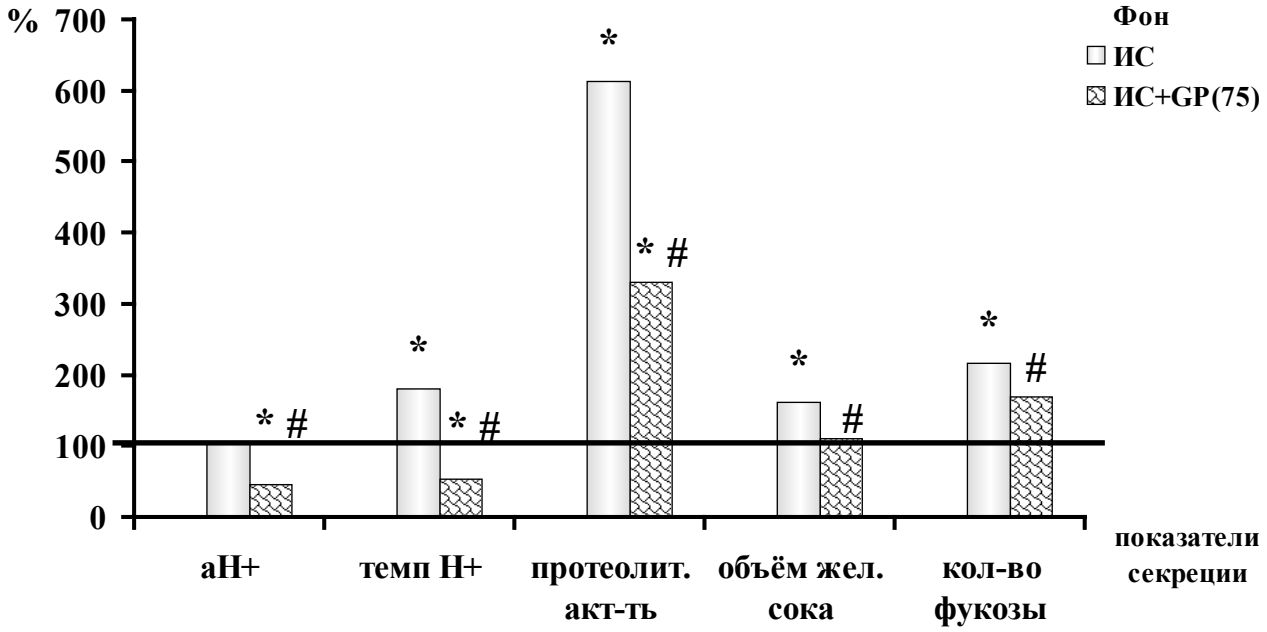

Рис. 5 Влияние введения GP за 30 минут до карбахолина после ИС на желудочную секрецию крыс

Примечания: 1 – активность H^+; 2 – темп секреции H^+; 3 – протеолитическая активность; 4 – объём желудочного сока; 5 – содержание фукозы; *, # - отличия относительно контроля и серии «ИС» значимы при $p<0,05$.

В опытах по изучению желудочной секреции на собаках была установлена роль GP как агента предотвращающего нарушение стресса, так и агента, который способен восстановить нарушенные иммобилизацией показатели секреторной активности желудка.

Введение GP после ИС собакам с исходно высокой секреторной активностью желудка приводило к увеличению объёма секрета, кислотности, сниженных действием иммобилизации, а также к росту темпа секреции H^+ (рис. 6). В данной группе собак объём секрета, темп секреции H^+, содержание фукозы после введения пептида соответствовали контрольным величинам, тогда как кислотность и протеолитическая активность желудочного сока не достигали контрольных значений.

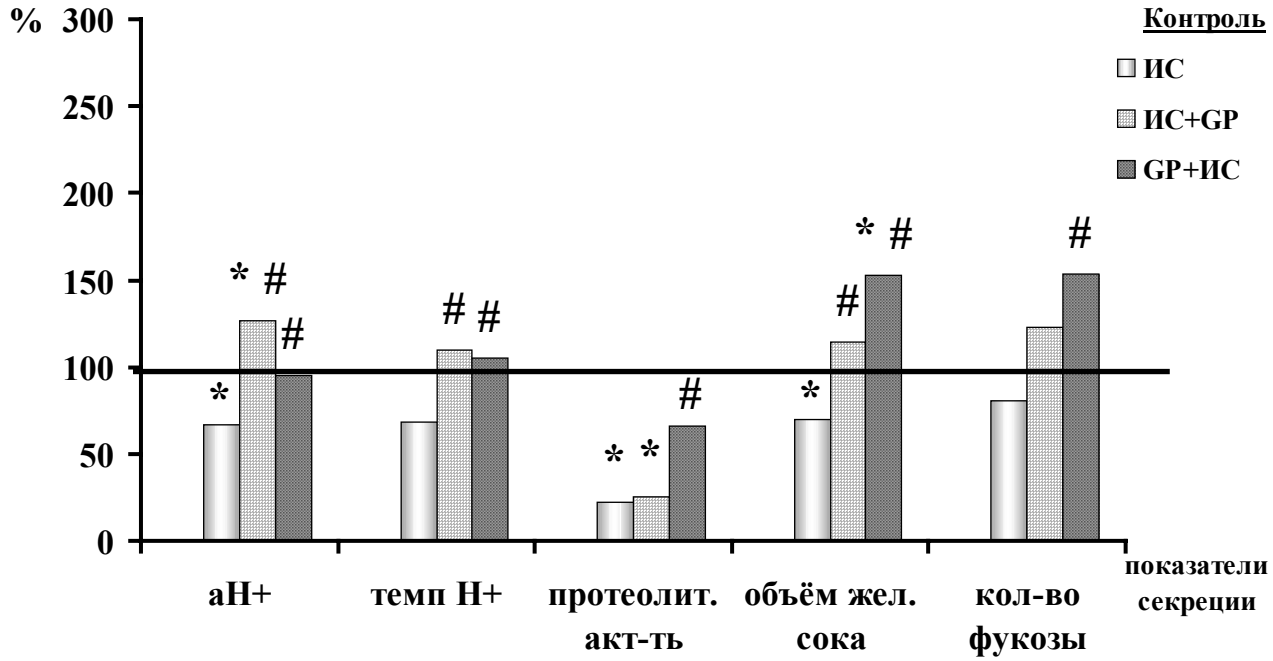

Рис. 6 Влияние пептида GP при ИС на секреторную активность желудка собак с исходно высоким уровнем секреции.

Примечания: 1 – активность H^+; 2 – темп секреции H^+; 3 – протеолитическая активность; 4 – объём желудочного сока; 5 – содержание фукозы; ИС+GP – введение пептида после ИС; GP+ИС – введение пептида перед ИС; *, # - отличия относительно контроля и серии «ИС» соответственно значимы при $p<0,05$.

Превентивное иммобилизации введение GP собакам с исходно высокой секреторной активностью желудка увеличивало объём секрета, кислотность и темп секреции H^+, протеолитическую активность, содержание фукозы, значения которых достигали контрольного уровня, тем самым, препятствуя развитию стрессорных нарушений. Однако, объём желудочного сока у этих собак после

введения пептида перед иммобилизацией превышал контрольный уровень по истечению стресса (рис. 6).

Введение GP после ИС собакам с исходно низкой секреторной активностью желудка привело к снижению кислотности сока, содержания фукозы, увеличенных иммобилизацией, а также к уменьшению объёма секрета и темпа секреции H^+ (рис. 7). У собак данной группы значения объёма секрета, темпа секреции H^+ и содержания фукозы при введении дипептида после ИС соответствовали контрольным значениям. Однако, в этой группе животных кислотность и протеолитическая активность значимо превышали контрольные величины.

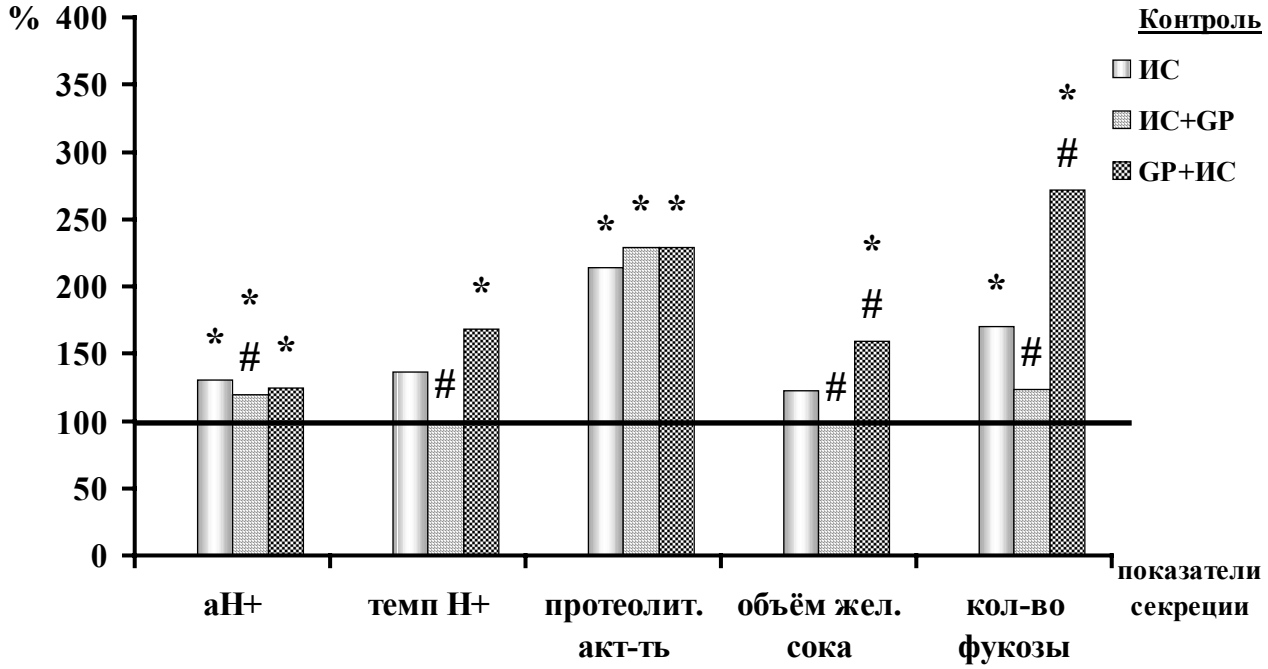

Рис. 7 Влияние пептида GP при ИС на секреторную активность желудка собак с исходно низким уровнем секреции

Примечания: 1 – активность H^+; 2 – темп секреции H^+; 3 – протеолитическая активность; 4 – объём желудочного сока; 5 – содержание фукозы; ИС+GP – введение пептида после ИС; GP+ИС – введение пептида перед ИС; *, # - отличия относительно контроля и серии «ИС» соответственно значимы при $p<0,05$.

Предварительное иммобилизации введение GP собакам с исходно низкой секреторной активностью желудка не изменяло агрессивные факторы желудочного секрета (темп секреции протонов, кислотность и протеолитическую ак-

тивность сока), которые оставались на уровне стрессорных значений, однако, увеличивало объём желудочного сока и содержание фукозы (защитные факторы СОЖ). В данной группе собак все выбранные показатели секреции превышали контрольные значения по истечению действия иммобилизации (рис. 7).

Таким образом, пролинсодержащие пептиды PGP и GP способны модулировать холинергические влияния на желудочную секрецию в нормальных физиологических условиях и в условиях ИС. Дипептид GP – структурный компонент PGP, обладает самостоятельной физиологической активностью в отношении желудочной секреции по сравнению со своим предшественником. Его эффект зависит от временного интервала между инъекциями дипептида и карбахолина, исходного уровня секреции желудка, направленности изменения секреции желудка под действием стресса и режима дозирования пептида (постстрессорное или превентивное стрессу введение пептида).

Реципрокное влияние стресса и пептида GP на желудочную секрецию крыс и собак говорит о способности последнего ограничивать стрессовые реакции и, возможно, о принадлежности GP к стресс-лимитирующим системам. Суть такого ограничения стрессорной реакции под влиянием GP может заключаться в изменении активности глюкокортикоидной функции надпочечников, нарушенной действием стресса. Данное предположение основано на полученных результатах. Так, введение GP одновременно с карбахолином после стрессорного воздействия у крыс вызывало значимое увеличение уровня кортикостероидов в плазме крови, уменьшенных действием иммобилизации (с (0,22 ± 0,005) мкмоль/л до (0,78 ±0,054) мкмоль/л, $p<0,05$). Введение GP за 30 минут до карбахолина не вызывало значимых изменений концентрации кортикостерона в плазме крови крыс. И в первом и во втором случаях уровень кортикостерона в плазме крови крыс значимо превосходил исходное значение (контроль). Между уровнем гормона в серии, когда GP вводили одновременно с карбахолином после иммобилизации и уровнем кортикостерона в серии, когда GP вводили за 30 минут до карбахолина после ИС не было значимых различий. Постстрессорное введение GP собакам с исходно высокой и низкой уровнями желудочной секре-

ции привело к уменьшению концентрации кортикостероидов в плазме крови, увеличенных под влиянием ИС (соответственно с (1,2 ± 0,04) мкмоль/л до (0,9 ± 0,03) мкмоль/л и с (1,6 ± 0,07) мкмоль/л до (1,1 ± 0,08) мкмоль/л, $p<0,05$). Предварительное действию иммобилизации введение GP не способствовало изменению стрессорного увеличения концентрации кортикостероидов у собак с исходно высокой секреторной активностью желудка, тогда как у собак с исходно низким секреторным потенциалом значимо снижало увеличивающийся при стрессе уровень гормона (с (1,6 ± 0,07) мкмоль/л до (1,2 ± 0,08) мкмоль/л, $p<0,05$).

На основании полученных результатов и данных литературы (Абрамова М.А. и др., 1998; Бабская Н.Е., Ашмарин И.П., 1998; Доведова Е.Л. и др., 1998; Жуйкова С.Е., 2003; Byun H.G., Kim S.K., 2002) в модулирующем действии PGP и GP в отношении секреторной функции желудка в нормальных физиологических условиях и при стрессе могут участвовать как центральные, так и периферические механизмы регуляции.

1) Пептиды PGP и GP могут осуществлять свои эффекты, **во-первых,** через влияние непосредственно на ткани желудка. **Во-вторых,** пептиды могут способствовать синтезу собственных пептидов, по физико-химическим свойствам близких к изучаемым, которые, возможно, и изменяют секреторную активность. **В третьих,** эффекты PGP и GP могут осуществляться через метаболиты, образующиеся при деградации пептидов.

2) Возможно эффекты пролинсодержащих пептидов связаны с их способностью активировать серотонинергическую систему, увеличивать содержание дофамина и норадреналина, снижать удельную активность моноаминоксидазы Б и ацетилхолинестеразы, а также увеличивать удельную активность моноаминоксидазы А в структурах мозга.

3) Не исключается способность PGP и GP корректировать функциональную активность желудка посредством включения холинергических механизмов и/или модулирующего влияния на эффекты ацетилхолина.

4) Сохранение эффекта действия пептидов в течение трёх часов после введения, несмотря на значительное уменьшение его концентрации в крови, по-видимому, говорит о возможном запуске каскадных реакций, которые изменяют уровень стрессорных нарушений желудочной секреции в зависимости от исходной секреторной активности органа.

5) Изменение секреторной активности желудка под действием GP у экспериментальных животных, которые подвергались стрессорному воздействию, по-видимому, может быть обусловлено способностью пептидов изменять уровень глюкокортикоидных гормонов.

ВЫВОДЫ

1. Дипептид GP - структурный компонент трипептида PGP, обладает самостоятельной физиологической активностью в отношении желудочной секреции и зависит от временного интервала между введениеми пептида и стимулятора секреции желудка: а) введение GP крысам одновременно с карбахолином уменьшало кислотность и содержание фукозы, но увеличивало протеолитическую активность желудочного сока; б) введение GP за 30 минут до карбахолина снижало объём желудочного сока, кислотность и темп секреции водородных ионов у крыс.

2. Характер влияния GP на секреторную активность желудка собак определялся исходным уровнем желудочной секреции. У собак с исходно высоким уровнем секреции желудка пептид вызывал увеличение только объёма желудочного сока, тогда как у собак с исходно низкой секрецией рост объёма сока сопровождался снижением кислотности, увеличением протеолитической активности и содержания фукозы.

3. Одновременное введение физиологического раствора и карбахолина после иммобилизации угнетало секреторную активность желудка крыс, а введение физиологического раствора за 30 минут до инъекции карбахолина её стимулировало. Иммобилизационный стресс способствовал ослаблению секреторной функции желудка у собак с исходно высоким уровнем желудочной секре-

ции и усилению кислотно-пептического фактора и образования фукозы у собак с исходно низкой секреторной активностью желудка.

4. PGP и GP уменьшали постстрессорные нарушения секреторной активности желудка крыс и собак. Степень и направленность их воздействия определялись особенностями структуры пептидов и постстрессорных нарушений секреции желудка. Введение пептидов стимулировало желудочную секрецию, ослабленную действием стресса, и снижало повышенную влиянием иммобилизации секреторную активность желудка.

5. Эффект GP, введённый перед иммобилизацией зависел от исходного уровня желудочной секреции животных. Дипептид обладал противострессорным действием у собак с исходно высокой секреторной активностью желудка и препятствовал развитию стрессорных нарушений. В группе собак с исходно низким уровнем желудочной секреции введение GP перед иммобилизацией не оказывало противострессорного действия, но усиливало защитные факторы слизистой оболочки желудка.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Гриднева В.И., Еськова Т.А. (Томова Т.А.), Самонина Г.Е., Копылова Л.Н. Влияние амилина и PGP на секреторную и экскреторную функцию желудка крыс // Физиология организмов в нормальном и экстремальном состояниях: Сб. стат. Всерос. конф. 18–19 декабря 2001.-Томск, 2001.С.193–197.

2. Гриднева В.И., Просекина Е.Ю., Еськова Т.А. (Томова Т.А.) Исследование действия регуляторных пептидов на секреторную активность желудка // Физиология организмов в нормальном и экстремальном состояниях: Сб. стат. Всерос. конф. 18 – 19 декабря 2001. - Томск, 2001. С. 190 – 193.

3. Еськова Т.А. (Томова Т.А.) Регуляция желудочной секреции посредством пролинсодержащего пептида после иммобилизационного стресса // 4-й съезд физиологов Сибири: Тез. докл. – Новосибирск, 2002. С. 88.

4. Гриднева В.И., Еськова Т.А. (Томова Т.А.), Мленик О.Н. Выяснение роли глипролинов в секреторном ответе желудка крыс после стрессорного воздействия // Вестник Томского государственного университета. – 2003. – № 8. – С. 51 – 53.

5. Еськова Т.А. (Томова Т.А.), Гриднева В.И. Корригирующее действие дипептида Gly-Pro на секреторную активность желудка // Российский физиологический журнал имени И.М. Сеченова. – 2004. – Т. 90, № 8. – С. 10.

6. Еськова Т.А. (Томова Т.А.) Модуляция пептидом Gly-Pro секреторной активности желудка собак после стресса // Электронный журнал «Исследовано в России».–2004.- № 3.– С. 1466-1474.

7. Томова Т.А. Роль Gly-Pro в формировании адаптационных реакций желудка к стрессорному воздействию // Бюллетень сибирской медицины. – 2005. – Т. 4, Прил. 1. – С. 11.

8. Томова Т.А. Превентивное и постстрессорное влияние Gly-Pro на секреторную активность желудка // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2006. - Т. 69, № 2. – С.36 – 38.