

GLY-PRO И АДАПТИВНЫЕ РЕАКЦИИ  
ПРИ МНОГОКОМПОНЕНТНОМ СТРЕССЕ

© 2020 г. Т. А. Томова<sup>1, \*</sup>, Т. А. Замошина<sup>2, 3</sup>, М. В. Светлик<sup>2, 3</sup>, М. Л. Седокова<sup>1</sup>,  
А. А. Гостюхина<sup>4</sup>, А. М. Фатюшина<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Томский государственный педагогический университет, Томск, Россия

<sup>2</sup>Сибирский государственный медицинский университет, Томск, Россия

<sup>3</sup>Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск, Россия

<sup>4</sup>Сибирский федеральный научно-клинический центр федерального  
медико-биологического агентства, Северск, Россия

\*E-mail: eskovata77@mail.ru

Поступила в редакцию 16.10.2019 г.

После доработки 01.12.2019 г.

Принята к публикации 02.12.2019 г.

В настоящем исследовании было изучено влияние пептида глицилпролина (Gly-Pro) на показатели реактивности и адаптивного потенциала при стимуляции парасимпатической нервной системы карбахолом в условиях последовательного сочетанного воздействия трех стрессирующих факторов: иммобилизации, оперативного вмешательства и процедуры инъекции. Последовательное сочетанное воздействие оперативного вмешательства в виде наложения лигатуры на пилорический отдел желудка, иммобилизации и процедуры инъекций физиологического раствора на фоне карбахола позволило выявить 4 варианта ответа организма крыс. Эти варианты характеризовались различными комбинациями содержания кортикостерона и отдельных субпопуляций лейкоцитов. Все варианты ответов сопровождалась развитием стресса, на что указывали индексы напряженности адаптации. Самые глубокие стрессорные реакции наблюдали у животных после иммобилизации и операции и сочетанном воздействии инъекций физиологического раствора и карбахола. Gly-Pro за счет модулирования парасимпатического звена вегетативной нервной системы и, вероятно, прямого влияния на надпочечники изменял содержание кортикостерона, отдельных субпопуляций лейкоцитов и индекс напряженности адаптации при многокомпонентном стрессе. В случае введения пептида одновременно с карбахолом, по-видимому, он действовал по резистентному (сопротивление, противодействие) пути адаптации, а в случае его предварительного введения перед карбахолом – по типу толерантности (выносливость, терпеливость).

*Ключевые слова:* глицилпролин (Gly-Pro), многокомпонентный стресс, иммобилизация, карбахол, физиологический раствор, адаптивные реакции, кортикостерон, лейкоциты

DOI: 10.31857/S0869813920020107

Изучение механизмов адаптации продолжает оставаться катализатором в решении прикладных вопросов современной медицины. В настоящее время широко изучаются вопросы адаптивной регуляции при старении [1], в динамике развития различных болезней [2], при физических нагрузках [3], при стрессе [4]. В естественных условиях существования на организм действует комплекс факторов од-

новременно или последовательно, длительно или кратковременно. Если хронический стресс играет роль в этиологии многочисленных заболеваний и требует огромных затрат со стороны организма, то, напротив, кратковременный — является одним из основополагающих механизмов выживания, который может быть использован клинически для безопасного и эффективного усиления иммунной защиты, а также функционально для повышения умственной и физической работоспособности [5]. Процесс поддержания функционального состояния организма происходит за счет нервных, иммунных и эндокринных звеньев регуляции, которые обеспечивают его сохранение, развитие и работоспособность в неадекватных условиях среды [6]. Важными составляющими устойчивости организма и активного развития адаптации являются глюкокортикоиды, продукция которых опосредована гипоталамо-гипофизарно-адреналовой системой, реагирующей на стресс [7]. Также одно из ведущих мест в адаптации на стресс занимает пептидергическое звено регуляции, которое в нейроиммуноэндокринных взаимодействиях считается универсальным [8]. Являясь сигнальными молекулами, пептиды, по мнению академика В.Т. Иванова: "... образуют тканевой полифункциональный и полиспецифичный "биохимический буфер", который смягчает метаболические колебания, что позволяет говорить о новой, ранее неизвестной системе регуляции на основе пептидов. Этот механизм дополняет давно известные нервную и эндокринную системы регуляции, поддерживая в организме своеобразный "тканевой гомеостаз" и устанавливая равновесие между ростом, дифференцировкой, восстановлением и гибелью клеток..." [9]. В медицинской практике уже сегодня применяют успешно лекарственные препараты на основе пептидов [10], но механизм их биологического действия во многом остается загадкой.

В результате исследований последних лет выделен новый класс пептидов — глипролины, включающий Gly-Pro (GP), Pro-Gly-Pro (PGP), циклический Gly-Pro (сGP), а также производные PGP, например, N-ацетилированный PGP (N-a-PGP) и N-метилированный PGP (N-m-PGP), которые имеют высокую стабильность в средах организма [11]. Как оказалось, они обладают широким спектром физиологической активности, включающим противострессорный [12], иммуномодулирующий [13], нейромодулирующий [14] и другие эффекты.

Целью настоящего исследования явилось выявление значимости Gly-Pro в адаптивных реакциях крыс в условиях холинергической стимуляции при многокомпонентном стрессе.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования выполнены в соответствии с принципами Базельской декларации и рекомендациями, согласно положениям: "Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных" (Приказ МЗ СССР № 742 от 13.11.84 г., № 48 от 23.01.85 г.), принципами надлежащей лабораторной практики (РФ ГОСТ Р-53434-2009) и одобрены комиссией по биоэтике Биологического института НИ ТГУ (№ 28 от 15.10.2019).

В данной работе изучали ответные реакции организма крыс на одновременные или дискретные сочетанные стрессорные воздействия, используя для их оценки маркеры скрытых функциональных резервов организма, и выявляли участие пептида Gly-Pro в этих реакциях. В качестве стрессорных воздействий использовали иммобилизацию, оперативное вмешательство в абдоминальную область и процедуру инъекции. Опыты проводились в утренние часы весной на 80 крысах-самцах (Вистар,  $210 \pm 30$  г) (ФГБУ "НИИ Фармакологии" СО РАМН, Томск). Иммобилизацию осуществляли однократно фиксацией крыс на спине за все конечности на операционном столике [15] на 18 ч. Оперативное вмешательство в абдоминальную

область проводили под эфирным наркозом с наложением лигатуры на пилорический отдел желудка для получения желудочного сока и дальнейшего его изучения. Инъекционный способ введения каких-либо фармакологических агентов и физиологического раствора как контроля к ним нередко используется в эксперименте, и, по признанию многих исследователей, является стрессирующим фактором для экспериментальных животных [16]. Спустя 2 ч после операции крысам вводили неизбирательный агонист М-, Н-холинорецепторов – карбахол (Reanal, Венгрия) внутримышечно в дозе 25 мкг/кг, моделируя сдвиги в функциональном состоянии парасимпатической нервной системы при стрессе. Время действия карбахола составляло 45 мин, являясь оптимальным промежутком времени, где наиболее явно проявлялись изменения под действием различных факторов, установленного экспериментальным путем. С карбахолом сочетали Gly-Pro (Senn Chemicals, Швеция) внутривентриально в дозе 1 мг/кг в объеме 1 мл на 200 г массы или физиологический раствор в эквивалентном количестве. При выборе используемой в работе дозы пептида руководствовались установленными противоязвенным, модулирующим активность медиаторов, препятствующим развитию стрессогенных нарушений эффектам и т.п. [14]. Время действия пептида составило 45 и 75 мин, что обусловлено пиками максимальной концентрации Gly-Pro в плазме после его введения [17].

Крысы случайным образом были разделены на 9 групп: группа № 0 – интактные крысы, которые не подвергались никаким воздействиям; группа № 1 – крысам производили одновременные инъекции карбахола и физиологического раствора после операции; группа № 2 – крысы получали инъекцию физиологического раствора за 30 мин до карбахола после операции; группа № 3 – крысам одновременно вводили карбахол и физиологический раствор после иммобилизации и операции; группа № 4 – крысы получали инъекцию физиологического раствора за 30 мин до карбахола после иммобилизации и операции; группа № 5 – крысы получали одновременно инъекции карбахола и Gly-Pro после операции; группа № 6 – крысы получали инъекцию Gly-Pro за 30 мин до карбахола после операции; группа № 7 – крысам производили одновременные инъекции карбахола и Gly-Pro после иммобилизации и операции; группа № 8 – крысы получали инъекцию Gly-Pro за 30 мин до карбахола после иммобилизации и операции. Крыс групп № 1, 3, 5, 7 декапитировали через 45 мин после введения физиологического раствора или пептида, а крыс относящихся к группам № 2, 4, 6, 8 декапитировали через 75 мин после введения физиологического раствора или пептида. Декапитацию всех животных производили под эфирным наркозом согласно Хельсинской декларации Всемирной медицинской организации о гуманном отношении к животным и приказу Минздрава СССР № 755 от 12.08.77 г. и правил проведения работ с использованием экспериментальных животных (РФ ГОСТ Р-53434-2009). Во время декапитации у крыс из артерии собирали кровь (2,5–5 мл) в пробирку, промытую гепарином.

В качестве критериев оценки постстрессорного состояния организма и его реактивности использовали изменения в составе крови, что согласуется с мнением многих исследователей [18, 19]. В рамках работы в крови определяли и рассчитывали: 1) содержание кортикостерона; 2) общее количество лейкоцитов и их отдельных морфологических форм в крови; 3) индекс напряженности адаптации по Л.Х. Гаркави (ИГ).

Содержание кортикостерона в сыворотке крови определяли после размораживания с помощью твердофазного иммуноферментного “сэндвич”-метода (ELISA). Процедура выполнения иммуноферментного анализа проводилась по инструкциям, предлагаемым производителями тест-систем (IBL, Германия). Перед использованием все реагенты прогревались до комнатной температуры. Каждый флакон с реагентом аккуратно перемешивался, избегая образования пены. Иммунофермент-

ный анализ проводился с использованием поликлональных антител кортикостерона, нанесенных на внутреннюю поверхность полистирола в микротитровальных ячейках. В ячейки микропланшета добавлялось по 100 мкл исследуемой сыворотки крови, стандартов кортикостерона с известными концентрациями и контрольного раствора из набора. Затем в каждую лунку вносилось по 100 мкл ферментного конъюгата и инкубировалось 16–20 ч при 2–8°C. После трехкратной автоматической промывки буфером в каждую ячейку добавлялось по 200 мкл раствора субстрата с красителем и пробы инкубировались при комнатной температуре. Через 30 мин раскапывалось по 50 мкл “стоп-реагента”. Измерения проводились с помощью планшетного фотометра StatFax 303 Plus (США) при длине волны 450 нм. Концентрация гормона вычислялась по калибровочной кривой из прилагаемого набора.

Подсчет общего количества лейкоцитов производили в счетной камере Горяева и лейкограммы на 250 клеток после окраски мазка по Романовскому с использованием микроскопа МБИ ЗУ42 Ломо. ИГ представлял собой отношение лимфоцитов (%) к сегментоядерным нейтрофилам (%) в условных единицах (усл. ед) [20] и критическое предстрессовое значение индекса напряженности адаптации для белых крыс составляло 1.6 усл. ед. [21]. Чем ниже значение ИГ в эксперименте, тем глубже стрессовая реакция.

Статистическая обработка данных выполнялась 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, оценка меры статистической значимости различий выполнялась с помощью непараметрических критериев Манна–Уитни (в случае сравнения двух независимых выборок) и Краскала–Уолиса (в случае сравнения трех и более независимых выборок), в качестве критерия статистической значимости считали значения при  $p < 0.05$ , результаты представлены в виде медианы анализируемого показателя (Me), 1-го и 3-го квартилей (Q1;Q3).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В настоящем исследовании изучалось влияние пептида Gly-Pro на показатели реактивности и адаптивного потенциала при стимуляции парасимпатической нервной системы карбахолом в условиях последовательного сочетанного воздействия трех стрессирующих факторов: иммобилизации, оперативного вмешательства и процедуры инъекции.

Одновременное сочетание инъекции физиологического раствора (контроль для Gly-Pro и карбахола крысам после операции (группа № 1) не сопровождалось какими-либо изменениями в содержании кортикостерона и нейтрофилов в крови в сравнении с аналогичными показателями интактных животных (табл. 1). Вместе с тем, в обсуждаемой группе наблюдалось пониженное содержание моноцитов и лимфоцитов, что обусловило низкий уровень суммарного количества лейкоцитов в крови по сравнению с аналогичными показателями интактных крыс. По данным литературы, критическое предстрессовое значение индекса напряженности адаптации для белых крыс составляет в среднем 1.6 усл. ед. [21]. В группе № 1 в указанных условиях индекс напряженности адаптации был значимо ниже критического практически на 25%, что указывало на развитие у них реакции стресса.

Если введение физиологического раствора проводилось за 30 мин до введения карбахола после операции (группа № 2), то наблюдались уже совершенно другие изменения исследуемых показателей. Во-первых, значительно понижался уровень кортикостерона и уменьшалось общее количество лейкоцитов по сравнению с аналогичными показателями интактных животных (табл. 1). Во-вторых, значения всех

**Таблица 1.** Влияние Gly-Pro и карбахола на показатели стресс-реакции у крыс в условиях многокомпонентного стресса (Me (Q1; Q3))

**Table 1.** Effect of GP and carbachol on stress response in rats under multicomponent stress (Me (Q1; Q3))

Показатели (Indicators)	Контроль Control				Пептид Peptide				
	группа № 0, <i>n</i> = 10	операция surgery		иммобилизация + + операция immobilization + + surgery		операция surgery		иммобилизация + + операция immobilization + + surgery	
		группа №1 кбх + ф.р., <i>n</i> = 14	группа №2 ф.р + 30 + кбх, <i>n</i> = 7	группа №3 кбх + ф.р., <i>n</i> = 8	группа №4 ф.р + 30 + кбх, <i>n</i> = 7	группа №5 кбх + Gly-Pro, <i>n</i> = 10	группа №6 Gly-Pro + 30 + кбх, <i>n</i> = 10	группа №7 кбх + Gly-Pro, <i>n</i> = 7	группа №8 Gly-Pro + 30 + кбх, <i>n</i> = 7
Общее количество лейкоцитов, × 10 <sup>9</sup> /л Total white blood cell count, × 10 <sup>9</sup> /L	7.4 (6.2; 9.5)	3.6 (3.1; 3.9) <i>p</i> <sub>0</sub> < 0.05	3.8 (3.880; 3.885) <i>p</i> <sub>0</sub> < 0.05	13.8 (10.3; 14.4) <i>p</i> <sub>0</sub> < 0.05	9.9 (7.0; 19.2) <i>p</i> <sub>0</sub> < 0.05	5.88 (4.4; 8.8) <i>p</i> <sub>1</sub> < 0.05 <i>p</i> <sub>0</sub> < 0.05	7.61 (5.9; 9.3) <i>p</i> <sub>1</sub> < 0.05	6.93 (6.0; 10.1) <i>p</i> <sub>1</sub> < 0.05 <i>p</i> <sub>0</sub> < 0.05	7.87 (7.0; 9.1) <i>p</i> <sub>1</sub> < 0.05
Абсолютное количество нейтрофилов, × 10 <sup>9</sup> /л Absolute number of neutrophils, × 10 <sup>9</sup> /L	2.3 (1.7; 2.5)	2.04 (1.8; 2.5)	6.6 (1.9; 13.9)	10.25 (7.8; 13.0) <i>p</i> <sub>0</sub> < 0.05	11.5 (6.3; 15.4) <i>p</i> <sub>0</sub> < 0.05	2.21 (1.3; 3.3)	3.9 (2.9; 6.4) <i>p</i> <sub>0</sub> < 0.05	6.82 (3.8; 9.8) <i>p</i> <sub>0</sub> < 0.05	5.1 (4.5; 5.6) <i>p</i> <sub>0</sub> < 0.05
Абсолютное количество моноцитов, × 10 <sup>9</sup> /л Absolute number of monocytes, × 10 <sup>9</sup> /L	0.3 (0.2; 0.5)	0.07 (0.05; 0.08) <i>p</i> <sub>0</sub> < 0.05	0.44 (0.1; 0.8)	0.47 (0.4; 0.6)	0.15 (0.09; 0.2) <i>p</i> <sub>0</sub> < 0.05	0.09 (0.07; 0.17) <i>p</i> <sub>0</sub> < 0.05	0.13 (0.06; 0.4) <i>p</i> <sub>1</sub> < 0.05	0.39 (0.2; 0.7)	0.51 (0.3; 0.8) <i>p</i> <sub>1</sub> < 0.05
Абсолютное количество лимфоцитов, × 10 <sup>9</sup> /л Absolute number of lymphocytes, × 10 <sup>9</sup> /L	5.3 (3.6; 7.4)	1.7 (0.9; 2.08) <i>p</i> <sub>0</sub> < 0.05	1.7 (1.2; 4.3)	1.8 (1.1; 3.2) <i>p</i> <sub>0</sub> < 0.05	2.9 (2.1; 3.6)	3.9 (3.1; 5.3) <i>p</i> <sub>1</sub> < 0.05	2.87 (2.3; 3.9) <i>p</i> <sub>0</sub> < 0.05	2.29 (1.9; 4.4)	2.25 (1.9; 2.3) <i>p</i> <sub>0</sub> < 0.05
Кортикостерон, нг/мл Corticosterone, ng/ml	195.9 (176.5; 216.3)	193.2 (168.2; 221.5)	49.3 (10.9; 104.2) <i>p</i> <sub>0</sub> < 0.05	79.7 (46.4; 152.9)	329.9 (219.8; 533.4)	208.8 (131.9; 473) <i>p</i> <sub>1</sub> < 0.05	335.5 (307.7; 473) <i>p</i> <sub>1</sub> < 0.05 <i>p</i> <sub>0</sub> < 0.05	263.9 (209; 335.3) <i>p</i> <sub>1</sub> < 0.05	442.6 (357.4; 483.9) <i>p</i> <sub>0</sub> < 0.05
ИГ, усл. ед. IG, conventional unit	3.0 (1.3; 4.1)	1.2 (1.0; 1.3) <i>p</i> <sub>0</sub> < 0.05	0.7 (0.3; 0.9) <i>p</i> <sub>0</sub> < 0.05	0.16 (0.1; 0.5) <i>p</i> <sub>0</sub> < 0.05	0.3 (0.27; 0.4) <i>p</i> <sub>0</sub> < 0.05	1.9 (1.3; 2.3) <i>p</i> <sub>1</sub> < 0.05	0.6 (0.4; 1.7) <i>p</i> <sub>0</sub> < 0.05	0.4 (0.3; 0.7) <i>p</i> <sub>0</sub> < 0.05	0.4 (0.3; 0.5) <i>p</i> <sub>0</sub> < 0.05

Me (Q1; Q3) – медиана анализируемого показателя (1-ый квартиль; 3-ий квартиль); *n* – количество животных; кбх – карбахол; ф.р. – физиологический раствор; ИГ – индекс напряженности адаптации; группа № 0 – интактные крысы, которые не подвергались воздействию стрессирующих факторов; группа № 1 – одновременные инъекции карбахола и физиологического раствора после операции; группа № 2 – инъекция физиологического раствора за 30 мин до карбахола после операции; группа № 3 – одновременные инъекции карбахола и физиологического раствора после иммобилизации и операции; группа № 4 – инъекция физиологического раствора за 30 мин до карбахола после иммобилизации и операции; группа № 5 – одновременные инъекции карбахола и Gly-Pro после операции; группа № 6 – инъекция Gly-Pro за 30 мин до карбахола после операции; группа №7 – одновременные инъекции карбахола и Gly-Pro после иммобилизации и операции; группа № 8 – инъекция Gly-Pro за 30 мин до карбахола после иммобилизации и операции; *p*<sub>0</sub> < 0.05 по сравнению с соответствующим показателем интактных крыс; *p*<sub>1</sub> < 0.05 по сравнению с соответствующим показателем крыс, получавшим ф.р. в данной модели.

Me (Q1;Q3) – median of the analyzed indicator (1st quartile; 3rd quartile); *n* – number of animals; cch – carbachol; s – saline; IG – index of adaptation intensity; group № 0 – intact rats that were not exposed to stressors; group №1 – simultaneous injections of carbachol and saline after surgery; group № 2 – injection of saline and after 30 minutes the introduction of carbachol after surgery; group № 3 – simultaneous injections of carbachol and saline after immobilization and surgery; group № 4 – injection of saline and after 30 min the introduction of carbachol after immobilization and surgery; group № 5 – simultaneous injections of carbachol and Gly-Pro after surgery; group № 6 – injection of Gly-Pro and after 30 min the introduction of carbachol after surgery; group № 7 – simultaneous injections of carbachol and Gly-Pro after immobilization and surgery; group № 8 – injection of Gly-Pro and after 30 min the introduction of carbachol after immobilization and surgery; *p*<sub>0</sub> < 0.05 compared to the corresponding index of intact rats; *p*<sub>1</sub> < 0.05 compared to the corresponding index of rats treated with saline in this model.)

остальных исследуемых показателей в этой группе соответствовали значениям аналогичных показателей интактных крыс, т.е. существенно не изменялось содержание лимфоцитов, нейтрофилов и моноцитов. При этом, индекс напряженности адаптации понижался практически на 60% от критического уровня, что указывало на нарастание стрессовой реакции у этой группы в сравнении с группой № 1.

В третьей серии экспериментов одновременное сочетание инъекции физиологического раствора и карбахола после иммобилизации и операции (группа № 3) сопровождалось третьим вариантом изменений исследуемых показателей в сравнении с таковыми интактной группы (табл. 1). Существенно не изменялось содержание в крови кортикостерона и моноцитов, но значительно повысился уровень нейтрофилов, за счет чего увеличилось общее количество лейкоцитов, а также снизилось содержание лимфоцитов. В этих условиях отметили сдвиг индекса напряженности адаптации на 90% в сравнении с критическим уровнем, что указывало на углубление стресс-реакции в условиях сочетанного воздействия иммобилизации, операции с последующими одновременными инъекциями физиологического раствора и карбахола.

Наконец, последний вариант стрессовой реакции наблюдался в случае, когда вводили физиологический раствор крысам за 30 мин до карбахола после иммобилизации и операции (группа № 4). Такое сочетание стрессорных воздействий значимо не изменяло уровень кортикостерона и содержание лимфоцитов в сравнении с аналогичными показателями интактных животных (табл. 1). Вместе с тем, в этой группе регистрировали высокое общее количество лейкоцитов за счет нейтрофилов и низкие содержание моноцитов по сравнению с аналогичными показателями интактных крыс. И в этом случае сдвиг индекса напряженности адаптации указывал на развитие стресс-реакции и отличался от критического уровня на 80%.

Таким образом, с помощью комплекса используемых показателей (содержание кортикостерона, количество лейкоцитов и их отдельных морфологических форм, индекс напряженности адаптации) нам удалось выявить на фоне холинергической стимуляции 4 варианта ответа организма крыс на комплекс стрессорных воздействий (оперативное вмешательство в виде наложения лигатуры на пилорический отдел желудка, иммобилизация и процедура инъекции физиологического раствора), предъявляемых в разной последовательности. Эти варианты характеризовались различными комбинациями содержаний кортикостерона и отдельных субпопуляций лейкоцитов. Все варианты ответов сопровождалось развитием стресса, на что указывали индексы напряженности адаптации. Самые глубокие стрессорные реакции наблюдали у животных после сочетанного последовательного воздействия иммобилизации, оперативного вмешательства и инъекций физиологического раствора с карбахолом.

Введение Gly-Pro одновременно с карбахолом после оперативного вмешательства (группа № 5) вызывало статистически значимые повышения содержания кортикостерона, абсолютного количества лимфоцитов по сравнению с аналогичными показателями крыс группы № 1, получавших физиологический раствор вместо пептида (табл. 1), обусловив соответствие этих показателей аналогичным у интактных крыс. Но при этом, пептид увеличивал общее количество лейкоцитов, уровень которых все же оказывался ниже чем у интактных крыс, и индекс напряженности адаптации практически на 60%, значение которого превысило критический уровень (1.6 усл. ед.), что означает отсутствие реакции стресс. Вместе с тем, пептид не влиял на содержание нейтрофилов и моноцитов, которые остались на уровне контрольных значений.

Введение Gly-Pro за 30 мин до введения карбахола крысам также после операции (группа № 6) сопровождалось статистически значимым увеличением содержания кортикостерона по сравнению с уровнем гормона у крыс контрольной группы № 2, и это значение было выше, чем у интактных крыс (табл. 1). Увеличение общего количества лейкоцитов под действием Gly-Pro практически привело к значениям

данного показателя, сравнимого с аналогичным у интактных крыс. Абсолютное количество лимфоцитов у прооперированных крыс, получавших пептид, по сравнению с интактными животными было низким. Индекс напряженности адаптации под действием пептида значимо не изменялся в сравнении с контрольной группой № 2 и соответствовал значению, указывающему на развитие стрессорной реакции.

Одновременное сочетание инъекции Gly-Pro и карбахола после иммобилизации и операции (группа № 7) увеличивало концентрацию кортикостерона в крови по сравнению с соответствующим показателем у крыс контрольной группы № 3, но так же, как и в контрольной группе, она не отличалась от таковой интактных крыс (табл. 1). Введение пептида сопровождалось уменьшением общего количества лейкоцитов по сравнению с контрольной группой. Однако их уровень оставался ниже, чем у интактных животных. Под влиянием Gly-Pro отсутствовали значимые изменения в содержании нейтрофилов, моноцитов и лимфоцитов в сравнении с аналогичными показателями соответствующего контроля, причем уровень лимфоцитов и моноцитов оказались в пределах значений интактных крыс. Индекс напряженности адаптации под действием пептида значимо не изменялся в сравнении с контрольной группой и также как в предыдущей группе № 6 соответствовал значению, указывающему на развитие реакции стресс.

Наконец, если пептид вводился за 30 мин до карбахола иммобилизованным и оперированным животным (группа № 8), то общее количество лейкоцитов снижалось, но увеличивалось абсолютное содержание моноцитов по сравнению с соответствующими показателями контрольной группы № 4. При этом обсуждаемые показатели в этой группе животных максимально приближались к таковым интактных крыс (табл. 1) и существенно не отличались от последних. Кроме того, пептид не изменял концентрацию гормона и индекс напряженности адаптации по сравнению с контрольной группой, что указывало на сохранение у животных стрессовой реакции.

Таким образом, изменения содержания кортикостерона, отдельных субпопуляций лейкоцитов и индекса напряженности адаптации организма посредством модуляции Gly-Pro холинергических влияний при многокомпонентном стрессе были обусловлены особенностями комбинаций стрессоров.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

В формировании компенсаторно-приспособительных реакций организма при экстремальных воздействиях кровь является ключевой гомеостатической системой [22, 23]. Кортикостероиды и показатели гемограммы отражают состояние гомеостатической системы и играют решающую роль в специфических и неспецифических адаптационных реакциях при любых типах воздействий; они, в конечном счете, определяют резистентность и реактивность организма [19]. Рядом исследователей показано, что при действии стрессоров основные гормоны и медиаторы стресса (норадреналин, адреналин и кортикостерон) перераспределяют субпопуляции лейкоцитов в организме [7, 24] и участвуют в перестройке активности вегетативных систем [25]. Они индуцирует перераспределение лейкоцитов между кровью и органами, направляя субпопуляции лейкоцитов в конкретные органы-мишени (места ранений, кожа, оболочки пищеварительного, урогенитального и дыхательного трактов и мозг, селезенка, легкие, костный мозг и лимфатические узлы) и, тем самым значительно повышая скорость, эффективность и регуляцию иммунного ответа [24].

В наших экспериментах продемонстрировано влияние сложного комплекса факторов, каждый из которых является стрессором разной степени выраженности. Сочетанное воздействие стрессирующих факторов в разной последовательности (операция, иммобилизация, инъекции) на фоне стимуляции парасимпатической нервной

системы сопровождается четырьмя типами ответных реакций, характеризующихся различными комбинациями содержаний кортикостерона и отдельных субпопуляций лейкоцитов, а также разными уровнями индекса напряженности адаптации.

Известно, что при комплексном воздействии между отдельными факторами устанавливаются особые взаимоотношения, при которых действие одного фактора в какой-то степени изменяет (усиливает, ослабляет и т.п.) характер воздействия другого, а также огромное значение имеет качество фактора и режим его воздействия [26]. В нашем случае реакция организма изменялась на комплекс раздражителей, которые воздействовали однократно с определенной последовательностью и режимом (дискретно). Время последовательного действия факторов в эксперименте составило не более 22 ч, что является первой фазой адаптационного процесса или срочной адаптацией, где адаптивные реакции протекают на основе готовых физиологических механизмов.

Одновременное сочетание инъекций используемых веществ (физиологического раствора и карбахола) после операции (общее время действия факторов 5 ч) обусловило самую низкую в нашем эксперименте напряженность адаптации (самый малый стресс), которая сопровождалась лейкоцитопенией, моноцитопенией и лимфопенией на фоне содержания кортикостерона, соответствующего уровню интактных крыс.

Дискретное применение инъекций физиологического раствора и карбахола после операции (общее время действия факторов 5 ч) обусловило несколько иную картину: при резко пониженном уровне гормона (ниже референсных значений) и лейкоцитопении, абсолютные количества нейтрофилов, моноцитов и лимфоцитов были сравнимы с таковыми интактных крыс, но напряженность адаптации существенно не отличалась от таковой при одновременном сочетании инъекций. Возможно, в этом случае мы столкнулись с пассивной формой адаптивного ответа, которая проявилась в ареактивности. По-видимому, ареактивность — это результат снижения реактивности рецепторов, торможения центральной части рефлекторной дуги или исключения (или снижения) реакции эффекторов в ответ на дискретное действие стрессорных факторов [26].

Одновременное сочетание физиологического раствора и карбахола после иммобилизации и операции (общее время действия факторов 22 ч) формировало самую высокую в нашем эксперименте напряженность адаптивных механизмов, но при этом лейкоцитоз, нейтрофилез, лимфоцитопения и концентрация кортикостерона была как у интактных крыс.

Наконец, введение физиологического раствора за 30 мин до карбахола после иммобилизации и операции (общее время действия факторов 22 ч) способствовало стрессу с высокими уровнями напряженности адаптивных механизмов, лейкоцитозу, нейтрофилезу, моноцитопении, хотя уровень кортикостерона находился при этом в пределах референсных значений.

Таким образом, особенности показателей неспецифического звена срочной адаптации при многокомпонентном стрессе были обусловлены качеством и количеством стрессоров в нашем эксперименте и дискретностью их предъявлений. Низкая напряженность адаптивных механизмов наблюдалась при использовании инъекций после операции, в то время как высокая — при сочетании иммобилизации и операции, где дискретность предъявлений инъекций не имела значения. Напротив, концентрация кортикостерона и содержание субпопуляций лейкоцитов зависели и от качества и количества стрессоров, а также дискретности предъявлений веществ.

Нельзя исключить, что в наших экспериментах при комплексном воздействии между отдельными факторами установились взаимоотношения, при которых действие одного фактора в какой-то степени изменило характер воздействия другого. Учитывая факт перекрестных отношений используемых факторов, уместно пред-



положить, что мы, возможно, наблюдали перекрестную адаптацию [26], при которой содержание кортикостерона уменьшалось, либо оставалось на уровне референсных значений после многокомпонентного стресса. Подобную картину изменений уровня кортикостерона в ответ на повторяющиеся стрессорные воздействия можно наблюдать в некоторых исследованиях [27]. Разные реакции на холинергическую стимуляцию при различном сочетании используемых факторов стресса, по-видимому, обусловлены многоканальным нейрогенным контролем через гипоталамо-гипофизарную и симпатoadреналовую системы, где варианты ответной реакции были спровоцированы сочетаниями стрессогенных факторов в различной последовательности. Учение Н.Е. Введенского о парабиозе указывает, что на одном и том же субстрате эффекты, закономерно переходящие от возбуждения к торможению, зависят от количественной характеристики раздражителя (частоты и силы) и от функциональной подвижности реагирующей структуры. В нашем случае на комплекс раздражителей, которые воздействовали однократно с определенной последовательностью и режимом (дискретно) мы получили различные функциональные состояния организма, реагирующего на холинергическую стимуляцию. Н.Е. Введенский подчеркивал, что на раздражители возбудимые ткани отвечают фазной реакцией (характеризующейся пониженной лабильностью), одинаковой во всех случаях, которую он назвал парабиозом. Если допустить, что различное сочетание используемых нами стрессорных факторов в эксперименте сформировали разные функциональные состояния животных, то, и, возможно, на холинергическую стимуляцию мы получили разные фазы парабиотической реакции.

При введении пептида вместо физиологического раствора одновременно с карбахолом после операции (общее время действия факторов 5 ч) наблюдалась тенденция к восстановлению уровня лейкоцитов и лимфоцитов, сниженных стрессом и значимо повышалась концентрация кортикостерона в пределах референсных значений. Следует отметить, что в этом случае Gly-Pro значимо снижал напряженность адаптации, тем самым демпфируя стресс. В случае применения Gly-Pro при ареактивности, когда он вводился после операции, но за 30 мин до карбахола (общее время действия факторов 5 ч) напряженность адаптации не изменялась, она оставалась на уровне стресса, но нормализовался уровень лейкоцитов и формировалась моноцитопения. Пептид значительно увеличивал содержание кортикостерона, тем самым, предупреждая ареактивность.

Введение Gly-Pro одновременно с карбахолом после иммобилизации и операции (общее время действия факторов 22 ч) вызывало лишь тенденцию к снижению напряженности адаптации, но так же, как и после операции пептид практически нормализовал уровень лейкоцитов и значимо повысил концентрацию гормона в пределах референсных значений.

Наконец, введение пептида за 30 мин до карбахола после иммобилизации и операции (общее время действия факторов 22 ч) поддерживало напряженность адаптации на уровне стресса, нормализуя уровень общего количества лейкоцитов и абсолютного количества моноцитов на фоне концентрации кортикостерона выше референсных значений.

Парасимпатические и симпатические нервные волокна образуют сплетения в корковой и мозговой зонах надпочечников. Карбахол, как известно, карбамоиловое производное спирта холина и, так же, как ацетилхолин, является прямым М-, и Н-холиномиметиком, но длительного действия. Максимальная плотность Н-холинорецепторов определяется в симпатических и парасимпатических ганглиях и мозговом слое надпочечников, их связывание с карбахолом приводит к повышению как симпатического, так и парасимпатического влияния на надпочечники, и повышению секреции адреналина. Исходя из того, что Gly-Pro усиливал ответ клеток на ацетилхолин в отношении кардиомиоцитов [28] и обладал сосудорасширяющим эф-

фектом, непосредственно воздействуя на сосудистые гладкомышечные клетки [29], мы посчитали возможным анализировать эффекты сочетанного назначения карбахола и Gly-Pro в нашем эксперименте аналогично. То есть, Gly-Pro потенцировал карбахоловую стимуляцию надпочечников, вероятно, усиливая кровоток как непосредственно, так и через симпатическое и парасимпатическое звено, тем самым обуславливая рост содержания кортикостерона в крови. В свою очередь, гормоны и медиаторы стресса (норадреналин, адреналин и кортикостерон) перераспределяли субпопуляции лейкоцитов в организме и участвовали в перестройке активности вегетативных систем [7, 24, 25].

Таким образом, Gly-Pro за счет модулирования парасимпатического звена вегетативной нервной системы и возможно, прямого влияния на надпочечники изменял неспецифические компоненты срочной адаптации при многокомпонентном стрессе, стремясь обеспечить динамическую устойчивость организму. В случае одновременного сочетания Gly-Pro и карбахола, по-видимому, пептид действовал по резистентному (сопротивление, противодействие) пути адаптации, оказывал противострессорное действие, повышая содержание кортикостерона в пределах референсных значений, снижал напряженность адаптации, пытаясь нормализовать общее количество лейкоцитов. В случае же дискретного предъявления инъекций Gly-Pro и карбахола, пептид действовал по толерантному (выносливость, терпеливость) пути адаптации, где формировал высокий уровень кортикостерона, не изменял напряженность адаптации и восстанавливал уровень лейкоцитов, измененный стрессорами.

Таким образом, Gly-Pro реализовывал компенсаторно-приспособительные реакции организма, выступая в роли эндогенного биологически активного вещества как элемента системы саморегуляции или буфера [9], призванного адаптировать организм к экстремальным воздействиям и участвующего в обеспечении перекрестной адаптации. Возвращаясь к учению Н.Е. Введенского о парабиозе, и, допуская предположение о том, что в эксперименте при различном сочетании факторов стресса нами получены фазы парабиоза на холинергическую стимуляцию, можно предположить, что пептид запускал парабиотическую реакцию. Вероятно, GP формировал тормозную фазу парабиоза, создавая границы ответа организма (показатели неспецифической резистентности) на уровне нормергического типа, предупреждая, таким образом, перевозбуждение органа и возможное развитие его патологии.

#### ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа имела финансовую поддержку из средств государственного бюджета

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pomatto L.C.D., Davies K.J.A. The role of declining adaptive homeostasis in ageing. *J. Physiol.* 595(24): 7275–7309. 2017.
2. Прусаков В.М., Прусакова А.В. Динамика риска заболеваемости и адаптационного процесса как показатели воздействия локальных факторов окружающей среды на население. *Гигиена и санитария.* 97(2): 124–131. 2018. [Prusakov V.M., Prusakova A.V. The dynamics of the risk of the morbidity and the adaptation process as indices of the impact of local environmental factors on the population. *Hygiene and Sanitation.* 97(2): 124–131. 2018. (In Russ)].
3. Witard O.C., Garthe I., Phillips S.M. Dietary protein for training adaptation and body composition manipulation in track and field athletes. *Int. J. Sport. Nutr. Exerc. Metab.* 29(2): 165–174. 2019.
4. Gibson O.R., Taylor L., Watt P.W., Maxwell N.S. Cross-Adaptation: heat and cold adaptation to improve physiological and cellular responses to hypoxia. *Sports Med.* 47(9): 1751–1768. 2017.
5. Dhabhar F.S. The short-term stress response – mother nature’s mechanism for enhancing protection and performance under conditions of threat, challenge, and opportunity. *Front. Neuroendocrinol.* 49: 175–192. 2018.
6. McCarty R. Learning about stress: neural, endocrine and behavioral adaptations. *Stress.* 19(5): 449–475. 2016.

7. Кондашевская М. В. Сравнительная анализ гормональных и поведенческих изменений в моделях посттравматического стрессового расстройства и остром стрессе. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 105(7): 879–887. 2019. [Kondashevskaya M.V. Comparative analysis of hormonal and behavioral changes in models of post-traumatic stress disorders and acute stress. Russ. J. Physiol. 105(7): 879–887. 2019. (In Russ)].
8. Fabry Z., Raine C.S., Hart M.N. Nervous tissue as an immune compartment: the dialect of the immune response in the CNS. Immunol. Today. 15(5): 218–224. 1994.
9. Ivanov V.T. Peptides as universal biological regulators. Herald Russ. Acad. Sci. 80(5): 419–429. 2010.
10. Filatova E., Kasian A., Kolomin T., Rybalkina E., Alieva A., Andreeva L., Limborska S., Myasoedov N., Pavlova G., Slominsky P., Shadrina M. GABA, selank, and olanzapine affect the expression of genes involved in gabaergic neurotransmission in IMR-32 Cells. Front. Pharmacol. 8(FEB): 89. 2017.
11. Шевченко К.В., Нагаев И.Ю., Андреева Л.А., Шевченко В.П., Мясоедов Н.Ф. Устойчивость пролинсодержащих пептидов в биологических средах. Биомед. химия. 65(3): 180–201. 2019. [Shevchenko K.V., Nagaev I.Yu., Andreeva L.A., Shevchenko V.P., Myasoedov N.F. Stability of Proline-Containing Peptides in Biological Media. Biomed. Khim. 65(3): 180–201. 2019. (In Russ)].
12. Томова Т.А. Превентивное и постстрессорное влияние глицилпролина (GLY-PRO) на секреторную функцию желудка. Эксперим. клин. фармакол. 69(2): 34–36. 2006. [Tomova T.A. Preventive and post-stressor effects of Gly - Pro on gastric secretion in dogs. Eksp. Klin. Farmakol. 69(2): 34–36. 2006. (In Russ)].
13. Kolomin T., Morozova M., Volkova A., Shadrina M., Andreeva L., Slominsky P., Limborska S., Myasoedov N. The temporary dynamics of inflammation-related genes expression under tuftsin analog selank action. Mol. Immunol. 58(1): 50–55. 2014.
14. Томова Т.А., Замощина Т.А., Светлик М.В. Влияние глицилпролина на показатели стимулированной карбахолом желудочной секреции у крыс в условиях многокомпонентного стресса. Эксперим. клин. фармакол. 81(12): 3–6. 2018. [Tomova T.A., Zamoshchina T.A., Svetlik M.V. The influence of glycylproline (gly-pro) peptide on the carbachol-stimulated secretory activity of stomach under multicomponent stress conditions. Eksp. Klin. Farmakol. 81(12): 3–6. 2018. (In Russ)].
15. Selye H. Stress and the reduction of distress. J. SC Med. Assoc. 75(11): 562–566. 1979.
16. Замощина Т.А., Мелешко М.В. Ритмомодулирующие свойства лития оксидирурата на фоне электролитического разрушения правого супрахиазматического ядра гипоталамуса. Эксперим. и клин. фармакология. 68(1): 13–16. 2005. [Zamoshchina T.A., Meleshko M.V. The rhythm-modulant effect of lithium hydroxybutyrate on the background of electrolytic lesion of the right suprachiasmatic nucleus of hypothalamus. Eksperimental'naya i Klinicheskaya Farmakologiya. 68(1): 13–16. 2005. (In Russ)].
17. Zolotarev Yu.A., Zhukova S.E., Ashmarin I.P., Vas'kovskii B.V., Samonina G.E. Metabolism of PGP peptide after administration via different routes. Bull. Exp. Biol. Med. 135(4): 361–364. 2003.
18. Колесникова Л.А., Оськина И.Н. Концентрация кортикостерона в крови и лейкоцитарная формула при изучении стресса у серых крыс с различными типами поведения. Известия АН Сер. Биологическая. 1: 88–92. 2003. [Kolesnikova L.A., Os'kina I.N. Blood corticosterone concentration and differential leukocyte count in stressed Norway rats with different modes of behavior. Izv. Akad. Nauk. Ser. Biol. 1: 88–92. 2003. (In Russ)].
19. Yeltokova M., Ulyanova O., Askarov M., Chernyshova A., Kozina L. Integral hematologic indices in the evaluation of the immunologic reactivity of the organism in a patient with complication of type 1 diabetes mellitus: a case of diabetic retinopathy after autologous mesenchymal stem cell transplant. Exp. Clin. Transplant. 17(1): 234–235. 2019.
20. Garkavi L.H., Zhukova G.V., Shikhliarova A.I., Evstratova O.F., Barteneva T.A., Gudzkova T.N., Bragina M.I., Maschenko N.M., Grigorov S.V., Sakun P.G. Antitumor action and other regulatory effects of low-intensity electromagnetic and chemical factors in an experiment. Biophysics. 59(6): 944–953. 2014.
21. Mulik A., Novochadov V., Bondarev A., Lipnitskaya S., Ulesikova I., Shatyry Y. New insights into genotype-phenotype correlation in individuals with different level of general non-specific reactivity of an organism. J. Integr. Bioinform. 13(4): 295. 2016.
22. Юшков Б.Г. Система крови и адаптация организма к экстремальным воздействиям. Вестн. РАМН. 3: 3–6. 2006. [Yushkov B.G. The blood system and the adaptation of the organism to extreme factors. Vestn. Ross. Akad. Med. Nauk. 3: 3–6. 2006. (In Russ)].
23. Semenza G.L. Involvement of oxygen-sensing pathways in physiologic and pathologic erythropoiesis. Blood. 114(10): 2015–2019. 2009.
24. Dhabhar F.S., Malarkey W.B., Neri E., McEwen B.S. Stress-induced redistribution of immune cells-from barracks to boulevards to battlefields: a tale of three hormones-curt richter award winner. Psychoneuroendocrinology. 37(9): 1345–68. 2012.
25. Reul J.M.H.M., Collins A., Saliba R.S., Mifsud K.R., Carter S.D., Gutierrez-Mecinas M., Qian X., Linthorst A.C.E. Glucocorticoids, epigenetic control and stress resilience. Neurobiol. Stress. 1: 44–59. 2015.
26. Меерсон Ф.З., Кругликов Р.И., Соломатина Е.С. Влияние адаптации к высотной гипоксии на фиксацию временных связей. Журн. высш. нервн. деятел. им. И.П. Павлова.

- 26(5): 1026–1031. 1976. [Meyerson F.Z., Kruglikov R.I., Solomatina E.S. The influence of adaptation to altitude hypoxia on the fixation of temporary connections. Zhurn. Vysshei. Nervn. Deyatelnosti. Im. I.P. Pavlova. 26(5): 1026–1031. 1976. (In Russ)].
27. Rabasa C., Gagliano R., Pastor-Ciurana J., Fuentes S., Belda X., Nadal R., Armario A. Adaptation of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis to daily repeated stress does not follow the rules of habituation: A new perspective. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 56(9): 35–49. 2015.
28. Babskaya N.E., Ashmarin I.P. Effect of the dipeptides Gly-Pro and Pro-Gly, glycine, and proline on cardiotropic effects of acetylcholine. *Bull. Exp. Biol. Med.* 126(8): 765–767. 1998.
29. Bakaeva Z.V., Badmaeva K.E., Sergeev I.Yu., Samonina G.E. Effect of glyprolines on norepinephrine tone of isolated rat aortic rings. *Bull. Exp. Biol. Med.* 135(4): 334–336. 2003.

### Gly-Pro and Adaptive Reactions under Multicomponent Stress

T. A. Tomova<sup>a,\*</sup>, T. A. Zamoshchina<sup>b,c</sup>, M. V. Svetlik<sup>b,c</sup>, M. L. Sedokova<sup>a</sup>,  
A. A. Gostyukhina<sup>d</sup>, and A. M. Fatyushina<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Tomsk State Pedagogical University, Tomsk, Russia

<sup>b</sup>Siberian State Medical University, Tomsk, Russia

<sup>c</sup>National Research Tomsk State University, Tomsk, Russia

<sup>d</sup>Siberian Federal Science-Clinical Center of Federal Medicobiological Agency, Seversk, Russia

\*e-mail: eskovata77@mail.ru

Here, we studied the effect of the Gly-Pro peptide on the reactivity and adaptive potential during the stimulation of the parasympathetic nervous system by carbachol under the conditions of successive combined effects of three stressors: immobilization, surgical intervention, and the injection procedure. Consistent combined effect of the surgical intervention in the form of the ligature application to the pyloric stomach, the immobilization, and the saline injection procedure under the carbachol allowed to identify 4 types of responses. These types were characterized by different combinations of corticosterone contents, and separate leukocyte subpopulations. All responses were accompanied by the stress development, as indicated by the adaptation intensity index. The most prominent stress reactions were observed in animals after the immobilization and surgery, and the combined effects of saline and carbachol injections. Through the modulation of the parasympathetic link of the autonomic nervous system, and probably the direct effect on the adrenal glands, Gly-Pro changed the corticosterone levels, individual leukocyte subpopulations, and the adaptation intensity index under multicomponent stress. In the case of the simultaneous peptide and carbachol administration, it apparently activated the resistant (resistance, counteraction) pathway of adaptation, and in the case when it was administered before carbachol, – the tolerance (endurance, patience) pathway.

**Keywords:** glycyproline (Gly-Pro), multicomponent stress, immobilization, carbachol, saline, adaptive reactions, corticosterone, leukocytes

### ЦИТИРОВАТЬ:

Томова Т.А., Замощина Т.А., Светлик М.В., Седокова М.Л., Гостюхина А.А., Фатюшина А.М. Gly-Pro и адаптивные реакции при многокомпонентном стрессе. *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова.* 106(2): 231–242.

DOI: 10.31857/S0869813920020107

### TO CITE THIS ARTICLE:

Tomova T.A., Zamoshchina T.A., Svetlik M.V., Sedokova M.L., Gostyukhina A.A., Fatyushina A.M. Gly-Pro and Adaptive Reactions Under Multicomponent Stress. *Russian Journal of Physiology.* 106(2): 231–242.

DOI: 10.31857/S0869813920020107