

УДК 577.112.6:577.112.382.

ВЛИЯНИЕ ГИДРОКСИПРОЛИН- И ПРОЛИНСОДЕРЖАЩИХ ГЛИПРОЛИНОВ НА ЭТАНОЛОВОЕ ЯЗВООБРАЗОВАНИЕ У КРЫС

К.Е. Багликова, А.В. Труфанова, З.В. Бакаева, Г.Е. Самонина,
Л.А. Андреева, П.А. Климова, Б.В. Васьковский

(кафедра физиологии человека и животных; e-mail: g_samonina@mail.ru; kema_baglikova@mail.ru)

Семейство глипролинов включает в себя дипептиды Gly-Pro, Pro-Gly, Нур-Gly и Gly-Нур, а также трипептиды, сочетающие в разных последовательностях те же аминокислотные остатки, например Pro-Gly-Pro, Нур-Gly-Pro, Pro-Gly-Нур и т.п. Эндogenous источником глипролинов является коллаген, изобилующий повторами триплетов Gly-X-Y, где в X и Y позициях чаще всего расположены пролин и 4-гидроксипролин (или аланин) соответственно (Ramshaw et al., 1998). Процентное содержание данных аминокислот в коллагене составляет: Gly — 33,5%, Pro — 11,8, Нур — 9,2, Ala — 10,9% (Raineu et al., 2002). Одним из источников образования глипролинов является гидролиз только что синтезированного коллагена (по данным разных авторов, от 10 до 60% от синтезированного коллагена) с образованием пептидов, состоящих менее чем из 5 аминокислот (Bienkowski, 1989; Rennard et al., 1982). Гидролиз пищевых соединительнотканых белков также может быть источником глипролинов. Добавление желатина (гидролизированный коллаген) в качестве пищевой добавки к обычному рациону крыс сопровождается четким протекторным противоязвенным эффектом на этаноловой модели язвообразования (Исаев и др., 2003).

Широкий круг биологических активностей глипролинов (влияние на систему гемостаза (Ляпина и др., 2002), нейропротекторные эффекты (Бадмаева и др., 2005), влияние на гомеостаз слизистой оболочки желудка (СОЖ) (Samonina et al., 2002; Жуйкова и др., 2003; Бакаева, Самонина, 2005), снижение дегрануляции тучных клеток (Умарова и др., 2003)) позволяет считать их перспективными фармакоагентами.

Ранее в нашей лаборатории были исследованы протекторные противоязвенные свойства таких глипролинов, как PG, GP, PGP. Замена Pro на Нур в дипептидах приводит к отмене противоязвенного эффекта в случае Нур-Gly. Gly-Нур, так же как и Gly-Pro, не эффективен в отношении этаноловых повреждений СОЖ (Бадмаева и др., 2004).

Патогенез повреждающего действия этанола включает множество различных механизмов, но на сегодняшний день большинство авторов сходятся во мнении, что при действии этанола нарушение гомеостаза слизистой желудка связано, в основном, с его прямым вазоконстрикторным действием

на кровеносные сосуды СОЖ с одновременным нарушением их проницаемости, что приводит к ишемии СОЖ и генерации свободных радикалов (Kalia et al., 1997; Ligumsky et al., 1995).

Цель исследования

В связи с тем, что в цепочках коллагена в значительных количествах были обнаружены последовательности, где пролин замещен на гидроксипролин, перед нами была поставлена задача: 1) выяснить, проявляют ли противоязвенную активность трипептидные фрагменты коллагена, в которых пролин замещен на гидроксипролин: Нур-Gly-Pro, Pro-Gly-Нур и сопоставить возможные эффекты пептидов с эффектом Pro-Gly-Pro; 2) исследовать влияние новых синтетических глипролиновых олигопептидов Gly-Pro-Gly, Gly-Pro-Gly-Pro, Pro-Gly-Pro-Gly, Pro-Gly-Pro-Gly-Pro, Pro-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro, Gly-Pro-Gly-Pro-Gly-Pro на гомеостаз слизистой оболочки желудка.

Материалы и методы исследования

В опытах на этаноловой модели язвообразования использовали белых беспородных крыс-самцов массой 200—250 г. За 18 ч до опыта животных лишали пищи и воды. Экспериментальные клетки с животными были снабжены специальными решетчатыми полами для исключения капрофагии.

Этаноловые повреждения вызывали внутрижелудочным введением 96°-го этанола (1 мл/200 г веса). Забой проводили через 1 ч после введения этанола. Этаноловые повреждения подсчитывали следующим образом: оценивали площадь отдельного повреждения в каждом желудке в мм², сумму площадей всех повреждений в данном желудке и среднюю площадь повреждений в каждой группе. Противоязвенное действие препарата оценивали по отношению площади повреждений у опытных животных к площади повреждений у контрольных крыс в процентах.

Исследуемые пептиды

Gly-Pro, Pro-Gly, Pro-Gly-Pro, Gly-Pro-Gly, Gly-Pro-Gly-Pro, Pro-Gly-Pro-Gly, Pro-Gly-Pro-Gly-Pro, Pro-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro, Gly-Pro-Gly-Pro-Gly-Pro,

Gly-Нур, Нур-Gly, Нур-Gly-Pro, Pro-Gly-Нур, растворенные в физиологическом растворе непосредственно перед экспериментом, вводили внутривентриально и внутривентриально за 1 ч до начала действия ulcerogenic agent в дозе 3,7 мкмоль/кг (а в случае внутривентриального введения еще и 0,37 мкмоль/кг) в объеме 0,5 мл/200 г массы тела экспериментального животного. Контрольные животные получали по той же схеме равный объем изотонического раствора натрия хлорида. В работе были использованы пептиды Нур-Gly, Gly-Нур, Pro-Gly ("Bachem"), Нур-Gly-Pro, Pro-Gly-Нур (синтезированы в Институте биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова), Gly-Pro (Швейцария), Pro-Gly-Pro, Gly-Pro-Gly, Gly-Pro-Gly-Pro, Pro-Gly-Pro-Gly, Pro-Gly-Pro-Gly-Pro, Pro-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro, Gly-Pro-Gly-Pro-Gly-Pro (синтезированы в лаборатории регуляторных пептидов Института молекулярной генетики РАН).

Статистическая обработка

Статистическую обработку результатов проводили при помощи компьютерного теста ANOVA с использованием параметрического LSD-теста. Различия считали значимыми при $P < 0,05$. Данные представлены в таблицах в виде среднего \pm стандартная ошибка среднего.

Результаты и обсуждение

На этаноловой модели язвообразования (внутрибрюшинное (табл. 1) и внутривентриальное (табл. 2, 3)

Таблица 1

Влияние внутрибрюшинного введения глипролинов в дозе 3,7 мкмоль/кг на этаноловое язвообразование у крыс

Группа	Средняя площадь, мм ²	Количество животных (n)	Значение P
Control	49,15 \pm 3,3	85	
GH	75,43 \pm 11,2	18	0,004341
HG	43,46 \pm 10,3	21	0,508370
HGP	70,82 \pm 9,7	4	0,230044
PGH	53,07 \pm 37,06	4	0,827582
GP	47,21 \pm 9,9	7	0,889166
PG	16,2 \pm 1,5	7	0,018103
PGP	15,69 \pm 3,1	18	0,000304
GPG	53,47 \pm 9,6	5	0,789857
GPGP	19,95 \pm 5	16	0,002586
PGPG	62,4 \pm 11,8	15	0,180211
PGPGP	40,41 \pm 8,7	16	0,363864
GPGPGP	21,98 \pm 4,4	17	0,004014
PGPPGP	50,31 \pm 14,6	12	0,914451

Таблица 2

Влияние внутривентриального введения глипролинов в дозе 3,7 мкмоль/кг на этаноловое язвообразование у крыс

Группа	Средняя площадь, мм ²	Количество животных (n)	Значение P
Control	47,28 \pm 3,2	81	
GH	43,52 \pm 8,6	8	0,712266
HG	30,61 \pm 4,6	8	0,102961
HGP	39,73 \pm 6,3	9	0,435287
PGH	54,05 \pm 15,9	7	0,536828
GP	47,04 \pm 5,2	11	0,978006
PG	8 \pm 2,2	11	0,000013
PGP	17,02 \pm 2,4	19	0,000022
GPG	52,77 \pm 5,5	11	0,534595
GPGP	13,22 \pm 2,3	7	0,001843
PGPG	46,53 \pm 16,4	7	0,945250
PGPGP	42,68 \pm 9,1	6	0,692992
GPGPGP	16,69 \pm 6,1	10	0,001017
PGPPGP	59,37 \pm 19,3	5	0,340724

Таблица 3

Влияние внутривентриального введения глипролинов в дозе 0,37 мкмоль/кг на этаноловое язвообразование у крыс

Группа	Средняя площадь, мм ²	Количество животных (n)	Значение P
Control	47,28 \pm 3,2	81	
GH	33,25 \pm 4	8	0,174181
HG	40,36 \pm 8,2	8	0,502330
HGP	39,47 \pm 6,8	9	0,424259
PGH	53,9 \pm 17,7	4	0,642229
PG	33,15 \pm 14,9	6	0,230451
PGP	17,06 \pm 3,8	17	0,000059
GPG	57,54 \pm 12,6	11	0,423689
GPGP	36,47 \pm 19,9	4	0,448411
PGPG	92,9 \pm 33,2	6	0,000130
PGPGP	59,41 \pm 29,4	4	0,394632
GPGPGP	17,76 \pm 6,6	13	0,000442
PGPPGP	134,25 \pm 34,8	4	0,000000

введение) гидроксипролиновые трипептиды Нур-Gly-Pro и Pro-Gly-Нур не только не снижали площадь этаноловых повреждений, а проявляли тенденцию к их увеличению. Дипептиды Gly-Нур и Нур-Gly, как было показано ранее, также не влияли на гомеостаз слизистой оболочки желудка, а Gly-Нур даже достоверно увеличивал их по отношению к контролю (Бадмаева и др., 2004). Из 9 исследуемых пролинсодержащих глипролинов повы-

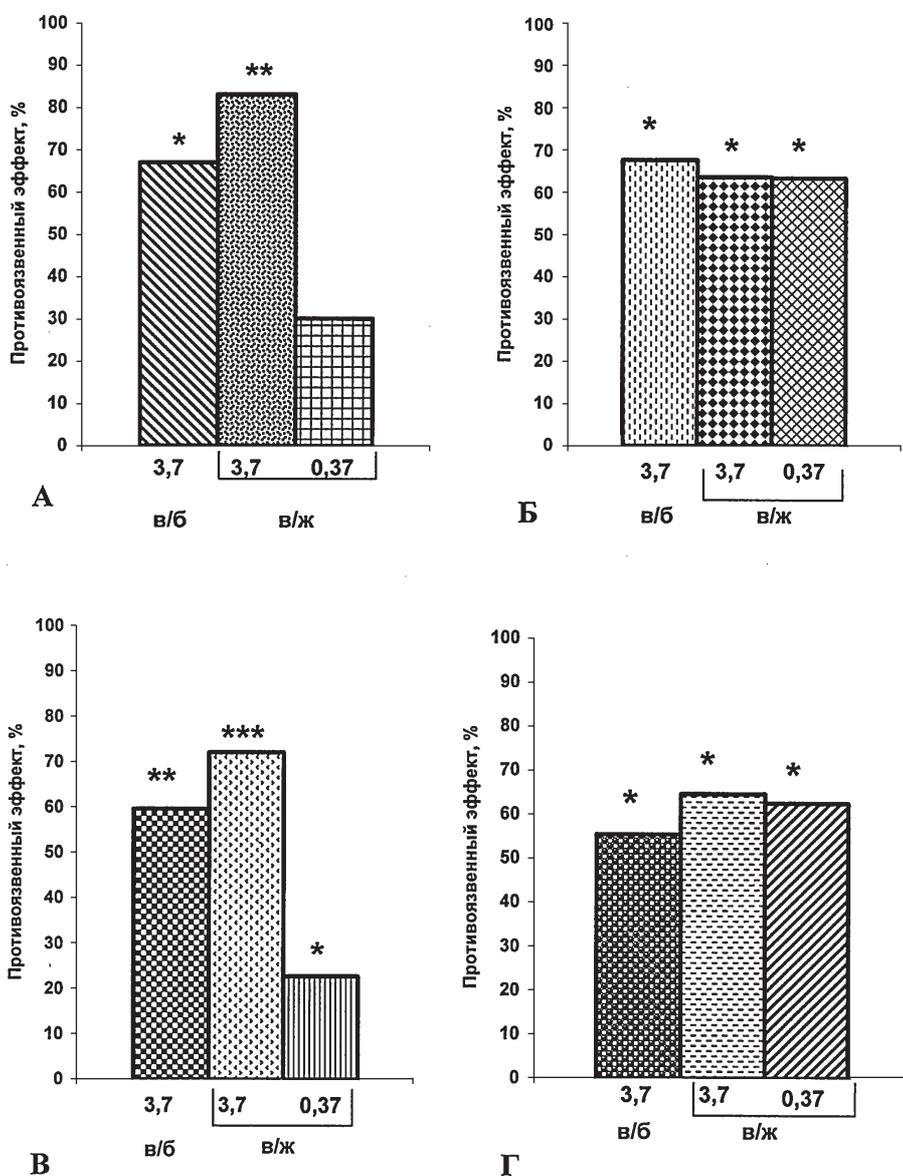
шают гомеостаз СОЖ к действию этанола только PG, PGP, GPGP, GPGPGP (табл. 1—3). Мы решили сопоставить величины противоязвенных эффектов для каждого из эффективных пролинсодержащих глипролинов при разных способах введения (внутрибрюшинном и внутрижелудочном) и введении разных доз (3,7 мкмоль/кг и 0,37 мкмоль/кг). При внутрибрюшинном введении (3,7 мкмоль/кг) все 4 пептида проявляли протекторную противоязвенную активность, причем тенденцию к наибольшей продемонстрировали PG и PGP, а к наименьшей — GPGPGP (рисунок). Введение такой же дозы внутрижелудочно привело к увеличению противоязвенного эффекта для PG и небольшой тенденции к уменьшению для GPGP и GPGPGP (рисунок). Противоязвенная активность PGP практически

не изменялась. PG и GPGP оказались не эффективны в отношении этаноловых повреждений при снижении дозы до 0,37 мкмоль/кг (рисунок). Противоязвенные эффекты PGP и GPGPGP в этой же дозе остались такими же, как и при введении дозы 3,7 мкмоль/кг.

Анализируя влияние исследуемых пептидов на этаноловое язвообразование у крыс, можно сделать вывод о том, что в дипептиде Gly-Pro замена Pro на Hup не влияет на величину этаноловых геморрагий, что совпадает с ранее полученными результатами нашей лаборатории (табл. 1). В Pro-Gly и Pro-Gly-Pro подобная замена приводит к обратному эффекту. Hup-Gly, в отличие от Pro-Gly, не влияет на величину этаноловых геморрагий (табл. 1). В Pro-Gly-Pro замена N- или C-концевого пролина на гидроксипролин также приводит к изменению противоязвенных свойств. Hup-Gly-Pro и Pro-Gly-Hup не только не уменьшают площадь этаноловых повреждений, но даже проявляют тенденцию к их увеличению (табл. 1).

Обобщая полученные нами результаты, следует отметить, что гидроксипролинсодержащие пептиды не эффективны в отношении периферических механизмов ulcerogenesis по сравнению с пролинсодержащими пептидами. Ранее было показано, что PG и PGP повышают устойчивость СОЖ к агрессивному воздействию этанола (Жуйкова и др., 2003). Из представленных синтетических пролинсодержащих пептидов лишь немногие обнаруживают протекторные противоязвенные свойства, а именно GPGP и GPGPGP. PPGP, PGP, PGPPG, также как и GP, не уменьшали повреждения, индуцируемые этанолом.

Возникает определенное противоречие при исследовании вклада гидроксипролин- и пролинсодержащих глипролинов в противоязвенный эффект желатина (гидролизированный коллаген) на этаноловой модели язвообразования. С одной стороны, опираясь на полученные нами данные, можно сделать вывод, что гидроксипролиновые ди- и трипептиды не могут влиять на этаноловое язвообразование. Поэтому противоязвенный эффект желатина может быть обусловлен именно пролинсодержащими пептидами, такими как Pro-Gly, Pro-Gly-Pro, Gly-Pro-Gly-Pro и др. С другой



Противоязвенные эффекты PG (А), PGP (Б), GPGP (В) и GPGPGP (Г), при внутрибрюшинном (в/б, 3,7 мкмоль/кг) и при внутрижелудочном (в/ж, 3,7 и 0,37 мкмоль/кг) введениях.

* — P < 0,05, ** — P < 0,01, *** — P < 0,001 по отношению к контролю

стороны, в литературе имеются данные, что при внутрижелудочном введении человеку желатиновых гидролизатов, полученных из кожи свиньи, куриных ножек и хряща, в крови наблюдалось значительное увеличение именно гидроксипролинсодержащих олигопептидов, таких как Pro-Нур, Pro-Нур-Gly и др. с преобладанием первого (Iwai et al., 2005). Однако следует подчеркнуть, что авторы изучали наличие в плазме крови только гидроксипролинов. Вполне вероятно, что при этом образуются многие другие фрагменты коллагена, в числе которых могут быть и простейшие глипролины (PG, PGP). Необходимо в дальнейшем исследовать возможное участие различных гидроксипролиновых пептидов в поддержании гомеостаза слизистой оболочки желудка на разных моделях язвообразования. Что касается отсутствия противоязвенных эффектов у многих исследуемых синтетических глипролинов, то здесь на данный момент трудно выявить структурно-функциональную зависимость противоязвенного действия пептидов. Эксперименты *in vitro* с исследованием фармакокинетики равномерно меченого тритием PGP в плазме крови человека демонстрируют высокую стабильность трипептида, который обнаруживается в значительных количествах даже через 4 ч инкубации. Преимущественным путем его биodeградации является отщепление N-концевого пролина под действием аминопептидазы с образованием Gly-Pro (Золотарев и др., 2006). Следует вывод, что противоязвенный эффект PGP в отношении гомеостаза слизистой желудка обусловлен воздействием именно це-

лой молекулы, а не ее дипептидными метаболитами. Данные *in vitro* согласуются с неопубликованными экспериментальными данными нашей лаборатории при исследовании фармакокинетики меченого PGP *in vivo* на самцах крыс. Нельзя забывать, что при действии аминопептидазы освобождается и пролин. Как было показано нами ранее, пролин на этаноловой модели язвообразования действительно повышает устойчивость СОЖ к воздействию этанола. Противоязвенный эффект его на данной модели составил 30%, что в два раза ниже противоязвенного эффекта PGP (Жуйкова и др., 2003). Это свидетельствует о воздействии на слизистую желудка именно целой молекулы трипептида. Что касается биodeградации тетрапептида GP GP, то здесь можно лишь предполагать 2 варианта: воздействие интактной молекулы либо образование PGP посредством отщепления Gly с N-конца аминопептидазой. Роль карбоксипептидаз скорее всего незначительна, так как образующийся при этом дипептид Gly-Pro не эффективен в отношении периферических механизмов язвообразования. В случае пента- и гексапептидов возможно образование большого количества метаболитов, противоязвенная активность которых не изучена. Необходимы конкретные эксперименты по исследованию их биodeградации.

* * *

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 06—04—48833).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ашмарин И.П., Бакаева З.В., Васильковский Б.В., Желязник Н.Я., Жуйкова С.Е., Золотарев В.А., Каменский А.А., Левицкая Н.Г., Ляпина Л.А., Мясоедов Н.Ф., Самонина Г.Е. 2003. Высокостабильные регуляторные олигопептиды — опыт и перспективы применения // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. № 4. 2—5.
- Бадмаева К.Е., Самонина Г.Е., Васильковский Б.В., Платонова Р.Д. 2004. Сопоставление противоязвенного действия пептидов, содержащих пролин или гидроксипролин на этаноловой и стрессорной моделях язвообразования // Вестн. Моск. ун-та. Сер. Биология. № 4. 6—9.
- Бадмаева С.Е., Копылова Г.Н., Самонина Г.Е., Левицкая Н.Г., Умарова Б.А. 2005. Влияние глипролинов на стрессогенные нарушения поведения крыс // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 91. № 5. 543—550.
- Бакаева З.В., Самонина Г.Е. 2005. Глипролины уменьшают развитие и ускоряют заживление ацетатных язв у крыс // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. № 2. 25—27.
- Жуйкова С.Е., Бакаева З.В., Самонина Г.Е. 2003. Дифференцированные противоязвенные

эффекты возможных метаболитов пептида PGP — PG и GP-на этаноловой и стрессорной моделях вызова язв у крыс // Вестн. Моск. ун-та. Сер. Биология. № 2. 20—22.

Золотарев Ю.А., Дадаян А.К., Долотов О.В., Козик В.С., Кост Н.В., Соколов О.Ю., Дорохова Е.М., Мешавкин В.К., Иноземцева Л.С., Габаева М.В., Андреева Л.А., Алфеева Л.Ю., Павлов Т.С., Бадмаева К.Е., Бадмаева С.Е., Бакаева З.В., Копылова Г.Н., Самонина Г.Е., Васильковский Б.В., Гривенников И.А., Зозуля А.А., Мясоедов Н.Ф. 2006. Равномерно меченные тритием пептиды в исследованиях по их биodeградации *in vivo* и *in vitro* // Биоорганическая химия. 32. № 2. 80—88.

Исаев В.А., Самонина Г.Е., Бакаева З.В., Желязник Н.Я., Жуйкова С.Е., Гусева А.А., Ляпина Л.А., Пасторова В.Е., Ашмарин И.П. 2003. Новый подход к снижению массы тела // Вопр. биол., мед. и фарм. химии. № 3. 45—47.

Ляпина Л.А., Пасторова В.Е., Ульянов А.М., Тарасов Ю.А., Ашмарин И.П. 2002. Влияние желатина и пептида Pro-Gly-Pro на состояние противосвертывающей системы и на развитие экс-

периментального диабета // Вестн. Моск. ун-та. Сер. Биология. № 1. 7—10.

Умарова Б.А., Копылова Г.Н., Смирнова Е.А., Гусева А.А., Жуйкова С.Е. 2003. Секреторная активность тучных клеток при стрессе — влияние пептидов пролил-глицил-пролина и семакса // БЭБиМ. **136**. № 10. 371—373.

Bienkowsky R.S. 1989. Intracellular degradation of newly synthesized collagen // *Rev. Biol. Celular.* **21**. 423—43.

Iwai K., Hasegawa T., Tagushi Y., Morimatsu F., Sato K., Nakamura Y., Higashi A., Kido Y., Nakabo Y., Ohtsuki K. 2005. Identification of food-derived collagen peptides in human blood after oral ingestion of gelatin hydrolysates // *Agricultural and food chemistry.* N 53. 6531—6536.

Kalia N., Brown N.J., Jacob S., Reed M.W., Bardhan K.D. 1997. Studies on gastric mucosal microcirculation. 1. The nature of regional variations induced by ethanol injury // *Gut.* **40**. 31—35.

Le J., Perier C., Peyroche S., Rascle F., Blanchon M.A., Gonthier R., Frey G., Chamson A. 1999. Urine glycy-L-proline increase and skin tropicity // *Amino Acids.* **17**. N 3. 315—322.

Ligumsky M., Sestieri M., Okon E., Ginsburg I. 1995. Antioxidants inhibit ethanol-induced

gastric injury in rat. Role of manganese, glycine, carotene // *Scand. J. Gastroenterol.* **30**. N 9. 854—860.

Pfister R.R., Haddox J.L., Sommers S.I., Lam K.W. 1995. Identification and synthesis of chemotactic tripeptides from alkali-degraded whole cornea: a study of N-acetyl-Proline-Glycine-Proline and N-methyl-Proline-Glycine-Proline // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **36**. 1306—1316.

Rainey J.K., Goh M.C. 2002. A statistically derived parameterization for the collagen triple-helix // *Protein Science.* N 11. 2748—2754.

Ramshaw J.A., Shah N.K., Brodsky B. 1998. Gly-X-Y tripeptide frequencies in collagen: a context for host-guest triple-helical peptides // *J. Struct. Biol.* **122**. N 1. 86—91.

Rennard S.I., Stier L.E., Crystal R.G. 1982. Intracellular degradation of newly synthesized collagen // *J. Invest. Dermatol.* **79**. N 1. 77—82.

Samonina G., Ashmarin I., Lyapina L. 2002. Glyproline peptide Family: review on bioactivity and possible origins // *Patophysiology.* **8**. 229—234.

Samonina G., Lyapina L., Kopylova G., Pastorova V., Bakaeva Z., Jeliashnik N., Zuykova S., Ashmarin I. 2000. Protection of gastric mucosal integrity by gelatin and simple proline-containing peptides // *Patophysiology.* **7**. 69—73.

Поступила в редакцию
28.12.06

INFLUENCE OF HYDROXIPROLINE- AND PROLINE-CONTAINING GLIPROLINE ON ETHANOL-INDUCED GASTRIC LESIONS IN RATS

*K.E. Baglikova, A.V. Trufanova, Z.V. Bakaeva, G.E. Samonina,
L.A. Andreeva, P.A. Klimova, B.V. Vas'kovsky*

It was studied the antiulcer action of hydroxiproline- and proline-containing glyproline on ethanol-induced gastric lesions in rats. Hydroxiproline-peptides are not effective concerning peripheral mechanisms of ulcer formation in contrast with proline-containing peptides. Protective ulcerogenic activity possess PG, PGP, GPGP, GPGPGP, which reduce the area of ethanol damages both at intraperitoneal and at intragastric injection.