

УДК 577.112.6:612.326:661.722:612.017.1

ИЗМЕНЕНИЕ ЦИТОКИНОВОГО ПРОФИЛЯ КРЫС ПРИ ПРОТЕКТОРНЫХ ПРОТИВОЯЗВЕННЫХ ЭФФЕКТАХ ГЛИПРОЛИНОВ. ВЛИЯНИЕ ГЛИПРОЛИНОВ (PGP и N-acetyl-PGP) НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ ЦИТОКИНОВ ПРИ ЭТАНОЛОВОМ ПОВРЕЖДЕНИИ ЖЕЛУДКА

А.Д. Сангаджиева, З.В. Бакаева¹, Г.Е. Самонина, А.А. Гусева,
И.М. Шаповал², В.А. Осипова², М.В. Мезенцева², Л.А. Андреева³

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

Исследовано влияние глипролинов (PGP и N-acetyl-PGP) на экспрессию генов цитокинов на этаноловой модели язвообразования. Определение активности мРНК в мононуклеарах периферической крови проводили с использованием методов обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции. Показано, что у контрольных животных образование этаноловых повреждений слизистой оболочки желудка в ряде случаев сопровождается угнетением транскрипции ИФН- α , ИЛ-6, ИЛ-12 и ФНО- α и увеличением транскрипции ИФН- γ , ИЛ-8, ИЛ-10. Пептид Pro-Gly-Pro уменьшает площадь повреждений на 38% на фоне достоверного повышения экспрессии гена ИЛ-1 β . Пептид N-acetyl-Pro-Gly-Pro не изменяет площадь этаноловых язв, хотя угнетает транскрипцию ИФН- α и ФНО- α ($p < 0,05$), а также ИФН- γ . Таким образом, гастропротекторный эффект PGP, возможно, опосредуется через ИЛ-1 β .

Ключевые слова: язва желудка, этанол, глипролины, цитокины.

Глицин- и пролинсодержащие аминокислотные последовательности образуются в организме при катаболизме и синтезе коллагена и входят в состав таких регуляторных пептидов, как энтеростатины, В-казоморфины и др. [1]. Они были выделены в отдельный класс и названы глипролинами (ГП) [2]. ГП оказывают разнообразные физиологические влияния на организм, нормализуя кровоток слизистой оболочки желудка (СОЖ) [3], уменьшая секрецию соляной кислоты и стимулируя бикарбонатную секрецию желудка [4], увеличивая сократительную активность лимфатических сосудов в брыжейке крыс [5], предотвращая активацию тучных клеток [6], повышая устойчивость СОЖ к действию ulcerогенных факторов [7, 8], изменяя поведенческую активность [9]. Глипролины выполняют также функцию хемотаксиса [10, 11, 17–19].

При исследовании различных ГП, начиная от ди- и кончая гексапептидами, было показано, что наибольшей противоязвенной активностью обладают трипептид Pro-Gly-Pro (PGP) и гексапептид Gly-Pro-Gly-Pro-Gly-Pro. Они проявляют как протекторные (введение пептида до воздействия ulcerогенного фактора), так и лечебные (введение пептида после воздействия ulcerогенного фактора) противоязвен-

ные эффекты [7, 8, 12]. PGP проявляет противоязвенное действие в отношении повреждений СОЖ, обусловленных как центральными, так и периферическими механизмами [7, 8]. Патогенез повреждающего действия этанола включает такой периферический механизм, как прямое вазоконстрикторное действие на кровеносные сосуды СОЖ с одновременным нарушением их проницаемости. Это приводит к ишемии СОЖ и генерации свободных радикалов, уменьшению продукции слизи и простагландинов, увеличению перекисного окисления липидов и освобождению гистамина [13].

С язвообразованием тесно связано воспаление СОЖ. Острые этапы воспаления характеризуются преобладанием активно фагоцитирующих лейкоцитов — макрофагов и нейтрофилов. Цитокины, включая хемокины, представляющие собой группу полипептидных медиаторов, участвуют в формировании и регуляции защитных реакций организма, в первую очередь регулируя развитие местных реакций в тканях [14, 15]. Цитокины взаимосвязывают неспецифические защитные реакции и специфический иммунитет, осуществляя связь между иммунной, нервной, эндокринной, кроветворной и другими системами.

В настоящее время имеется огромное количество данных относительно эндогенной регуляции неспе-

¹ РНИМУ им. Н.И. Пирогова, г. Москва.

² ФГБУ НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи Минздравсоцразвития России, г. Москва.

³ Институт молекулярной генетики РАН, г. Москва.

цифических факторов защиты, в частности лейкоцитов, как в физиологических реакциях, так и при патологии. Ключевую роль в ответе на повреждающее действие патогенных агентов играют цитокины, которым свойственны как центральные, так и периферические эффекты относительно влияний на механизмы неспецифической защиты организма [16].

Как было отмечено выше, глипролины PGP и N-acetyl-PGP (Ac-PGP) вызывают хемотаксис нейтрофилов [10, 11]: пролил-эндопептидаза совместно с матриксными металлопротеиназами 8 и 9 (ММП-8, ММП-9) разрушает коллаген и освобождает в кровоток PGP, который выполняет функцию хемотактанта для нейтрофилов [17]. По последним данным, при хроническом воспалении участвует и Ac-PGP [18]. Авторы полагают, что привлеченные к участию полиморфноядерные клетки (ПМК) крови могут связываться либо с хемокинами, либо с Ac-PGP через цистеин-х-цистеин рецептор (CXCR) 1 и CXCR 2. В дальнейшем ММП-9 приводит к непрерывному гидролизу коллагена с продукцией Ac-PGP. Этот путь формирует положительную прямую связь между Ac-PGP, ПМК и ММП-9.

Целью настоящей работы было исследование влияния PGP и Ac-PGP на экспрессию генов цитокинов при этаноловой модели язвообразования.

Материалы и методы

В экспериментах были использованы самцы белых беспородных крыс массой 250—300 грамм. Животные перед экспериментом подвергались 18-часовой пищевой и водной депривации. Эксперименты проводили в соответствии с нормативными документами, рекомендованными Европейским научным фондом (ESF), и декларацией о гуманном отношении к животным. Клетки с животными были снабжены специальными решетчатыми полами для исключения капрофагии.

Этаноловые язвы желудка у крыс вызывали интрагастральным введением с помощью зонда 96%-го этанола в объеме 1 мл/200 г/массы. Крысы были разделены на 3 группы: 1 контрольная и 2 опытных. Животным опытных групп за час до проведения эксперимента интраназально вводили PGP или Ac-PGP в дозе 3,7 мкмоль/кг в объеме 10 мкл/200 г массы; контрольной группе — физиологический раствор в том же объеме. PGP и Ac-PGP были синтезированы в Институте молекулярной генетики РАН. Эвтаназию осуществляли через 2 ч после введения пептидов. Для исследования СОЖ вырезали желудок, разрезали по малой кривизне и под бинокулярной лупой с окуляр-микрометром рассчитывали площадь каждого повреждения, суммарную площадь повреждений желудка и среднюю площадь повреждений для каждой из групп. Противоязвенное действие препарата оценивали по отношению средней площади повреждений у опытных животных к площади повреждений у контрольных крыс и выражали в процентах.

Определение активности мРНК 10 цитокинов в мононуклеарах периферической крови (МПК) проводили с использованием методов обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции (ПЦР). Выделение РНК проводили по методике Р. Chomczynsky, N. Sacchi [20] методом кислой гуанидин тиоцианат—фенол—хлороформ экстракции. Обратная транскрипция и ПЦР-амплификация были выполнены в соответствии с методикой, предложенной Gelder [21]. В работе были использованы пары праймеров для крыс для следующих цитокинов: интерферон (ИФН)- α , ИФН- γ , интерлейкин (ИЛ)-1 β , ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10, ИЛ-12, фактор некроза опухоли (ФНО)- α . В качестве положительного контроля использовали β -актин. Регистрацию результатов ПЦР осуществляли электрофоретически в 2,5%-м агарозном геле, окрашенном бромистым этидием. Для идентификации нуклеотидных последовательностей использовали маркер для электрофореза фирмы “Promega”. По степени свечения ПЦР продуктов оценивали наличие, отсутствие либо низкую экспрессию мРНК. Статистическую обработку результатов проводили с использованием непараметрических критериев: Вилкоксона, Крускала—Уолиса, Манна—Уитни.

Результаты исследований

Этанол вызывал повреждения СОЖ, площадь которых в контрольной группе составила в среднем 147 мм² (рис. 1). PGP уменьшал площадь повреждений СОЖ до 91 мм²; противоязвенный эффект равен 38%. Ac-PGP, как и следовало ожидать, практически не изменял площадь этаноловых повреждений — 137 мм².

Как отмечалось ранее, PGP в меньшей степени, чем Ac-PGP, привлекает нейтрофилы в зону воспаления, однако достоверно защищает СОЖ от воздействия ulcerогенных факторов [10]. Этот факт позволяет предположить минимальный вклад хемотактантных свойств глипролинов в их антиульцерогенное действие.

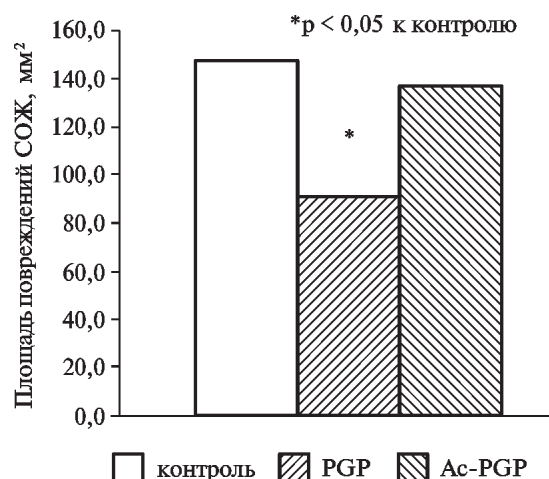


Рис. 1. Площадь повреждения слизистой оболочки желудка у беспородных крыс при этаноловом повреждении СОЖ

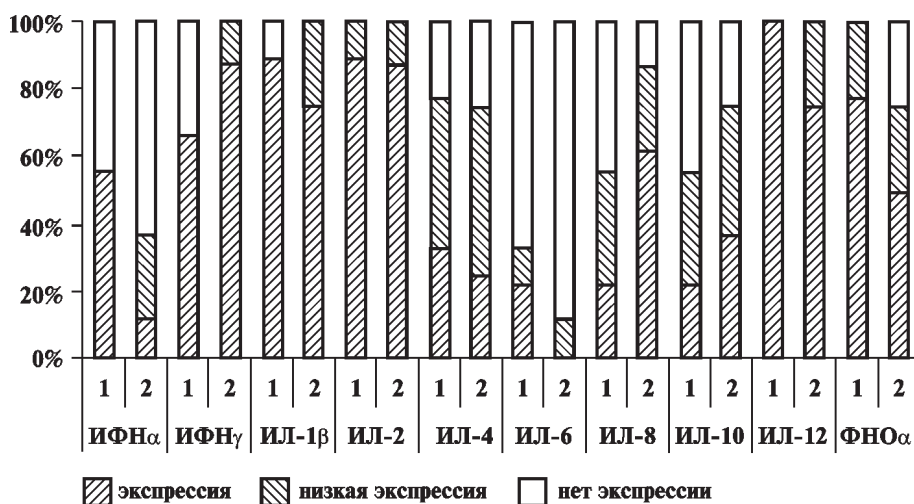


Рис. 2. Изменение цитокинового профиля крыс после внутрижелудочного введения этанола в контроле (на фоне физиологического раствора). По оси ординат указано количество животных, принятое за 100% для каждой группы; по оси абсцисс цифра 1 — фон (забор крови до каких-либо введений), 2 — через 2 ч и 1 ч после интраназального введения физиологического раствора и последующего внутрижелудочного введения этанола соответственно

Интраназальное введение физиологического раствора не влияло на экспрессию генов цитокинов. Исследование цитокинового профиля крыс через 1 ч после введения этанола показало, что однократное внутрижелудочное введение этанола в контрольной группе не вызывало достоверно значимых изменений экспрессии генов цитокинов. Однако в ряде случаев после этанола это сопровождалось небольшим увеличением числа животных, у которых выявлена активация экспрессии следующих цитокинов: ИФН-γ, ИЛ-8, ИЛ-10 и угнетение ИФН-α, ИЛ-1β, ИЛ-6, ИЛ-12, ФНО-α (рис. 2).

Было отмечено (рис. 3), что через час после введения этанола на фоне действия PGP увеличивалось

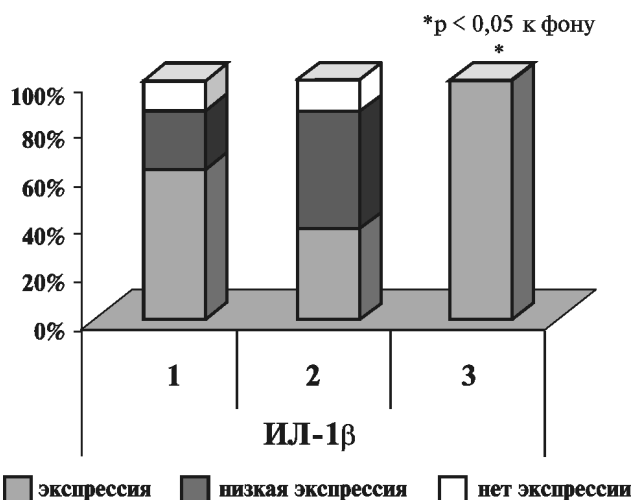


Рис. 3. Влияние PGP на цитокиновый профиль беспородных крыс при введении этанола. По оси ординат указано количество животных (% в каждой группе), по оси абсцисс: 1 — фон (1-й забор крови осуществляли до каких-либо манипуляций), 2 — после интраназального введения PGP, 3 — после внутрижелудочного введения этанола

число животных с экспрессией гена ИЛ-1β ($p < 0,05$). В отношении других цитокинов значительных изменений выявлено не было.

Через час после введения Ас-PGP достоверно угнетал транскрипцию ИФН-α и ФНО-α ($p < 0,05$). Введение этанола на фоне Ас-PGP не сопровождалось значительными изменениями. Данные литературы свидетельствуют об отсутствии у Ас-PGP противоязвенного эффекта [24], что было подтверждено и нами (рис. 1). После введения этанола экспрессия генов цитокинов на фоне Ас-PGP изменилась незначительно (рис. 4).

Обсуждение результатов

Однократное внутрижелудочное введение этанола в контрольной группе не вызывало достоверно значимых изменений экспрессии генов цитокинов, хотя наблюдался цитокиновый дисбаланс. В группе PGP на фоне воздействия этанола повысилась транскрипция цитокина ИЛ-1β. Этот цитокин относится к одним из ключевых провоспалительных цитокинов, в основном продуцируется макрофагами и фагоцитами, а также лимфоцитами, фибробластами и эпителиальными клетками. Однако, по некоторым литературным данным, ИЛ-1β играет важную физиологическую роль в поддержании целостности СОЖ при пероральном введении этанола и обладает про-

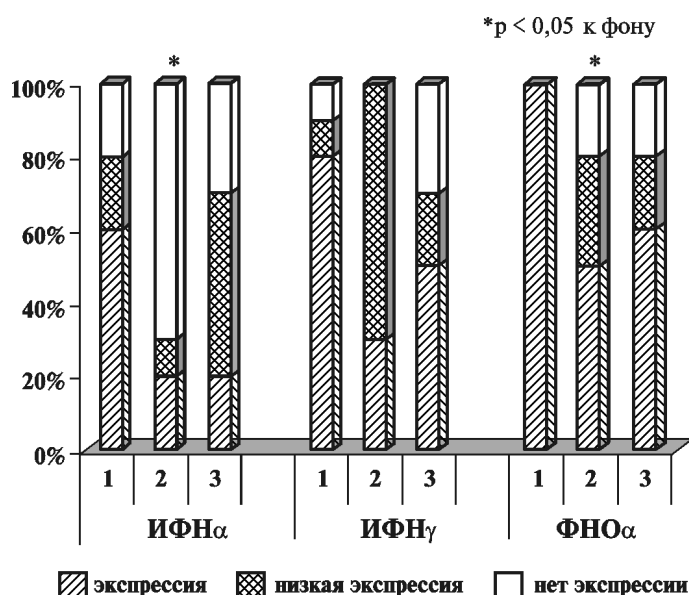


Рис. 4. Влияние N-acetyl-PGP на цитокиновый профиль беспородных крыс при введении этанола. По оси ординат указано количество животных (% в каждой группе), по оси абсцисс цифра 1 — фон (1 — забор крови осуществлялся до каких-либо манипуляций), 2 — через 1 ч после интраназального введения Ас-PGP, 3 — через 1 ч после внутрижелудочного введения этанола

тивоязвенным эффектом, стимулируя синтез простагландинов в желудке у крыс *in vitro* и угнетая секрецию кислоты в желудке *in vivo* [22, 23]. Кроме того, ИЛ-1 β модулирует двигательную функцию желудка [22]. Мы полагаем, что протекторное противоязвенное действие трипептида PGP в этаноловой модели язвообразования может быть опосредованно через повышение экспрессии гена ИЛ-1 β .

Ас-PGP угнетает транскрипцию провоспалительных цитокинов ИФН- α и ФНО- α . Данные цитокины являются участниками в запуске неспецифического иммунного ответа. Освобождая свободные радикалы кислорода, они могут способствовать нарушению целостности слизистой оболочки желудка. Поэтому не-

понятно, почему Ас-PGP, уменьшая транскрипцию этих провоспалительных цитокинов, не обладает противоязвенным эффектом.

Выводы

1. Протекторное противоязвенное действие глипролина PGP в отношении СОЖ при этаноловой модели язвообразования развивается на фоне достоверного повышения экспрессии гена ИЛ-1 β .

2. Ас-PGP — известный хемоаттрактант, не проявляющий протекторного противоязвенного эффекта, вызывает угнетение транскрипции ИФН- α и ФНО- α ($p < 0,05$).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ашмарин И.П. Глипролины в составе регуляторных трипептидов // *Нейрохимия*. 2007. Т. 24. № 1. С. 5—7.
2. Ашмарин И.П., Каменский А.А., Ляпина Л.А., Самонина Г.Е. Глипролины как самостоятельные регуляторы и стабилизаторы других пептидов // *Вопр. биол. мед. фарм. химии*. 2002. № 1. С. 24—27.
3. Самонина Г.Е., Копылова Г.Н., Сергеев В.И., Жуйкова С.Е., Бакаева З.В. Коррекция кровотока желудка как один из возможных механизмов противоязвенных эффектов коротких пролинсодержащих пептидов // *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова*. 2001. Т. 87. № 11. С. 1488—1492.
4. Бакаева З.В., Самонина Г.Е., Чудаков Л.И. Влияние глипролинов на базальное и стимулированное выделение кислоты и бикарбонатов в желудке крыс // *Вопр. мед. биол. и фарм. химии*. 2004. № 2. С. 30—34.
5. Умарова Б.А., Лелекова Т.В., Копылова Г.Н., Гончарова Е.Л., Бакаева З.В., Самонина Г.Е. Роль протекторных эффектов пролинсодержащих пептидов (PGP, PG, GP) в нарушении сократительной функции лимфатических сосудов брыжейки при экспериментальном остром перитоните у крыс // *БЭБиМ*. 2006. Т. 142. № 9. С. 248—251.
6. Умарова Б.А., Копылова Г.Н., Смирнова Е.А., Гусева А.А., Жуйкова С.Е. Секреторная активность тучных клеток при стрессе — влияние пептидов пролил-глицилпролина и семакса // *БЭБиМ*. 2003. Т. 136. № 10. С. 371—373.
7. Самонина Г.Е., Копылова Г.Н., Умарова Б.А. Трипептид Pro-Gly-Pro и гомеостаз слизистой оболочки желудка // *Нейрохимия*. 2008. Т. 25. № 1—2. С. 128—131.
8. Фалалеева Т.М., Самонина Г.Е., Береговая Т.В., Андреева Л.А., Дворченко Е.В. Влияние глипролинов PGP, GP, PG на гомеостаз слизистой оболочки желудка при этаноловой модели язвообразования у крыс // *БЭБиМ*. 2010. Т. 149. № 1. С. 30—34.
9. Копылова Г.Н., Бакаева З.В., Бадмаева С.Е., Умарова Б.А., Самонина Г.Е., Гусева А.А. Терапевтические эффекты глипролинов (PGP, GP, PG) в отношении стрессогенных нарушений поведения крыс // *БЭБиМ*. 2007. Т. 143. С. 124—127.
10. Haddox J.L., Pfister R.R., Muccio D.D., Villain M., Sommers C.I. et al. Bioactivity of peptide analogs of the neutrophil chemoattractant, N-acetyl-proline-glycine-proline // *Invest Ophthalmol. Vis. Sci*. 1999. Vol. 40. N 10. P. 2427—2429.
11. Gaggari A., Jackson L.P., Noerager D.B. et al. A novel proteolytic cascade generates an extracellular matrix-derived chemoattractant in chronic neutrophilic inflammation // *J. Immunol*. 2008. Vol. 180. P. 5662—5669.
12. Труфанова А.В., Багликова К.Е., Бакаева З.В., Самонина Г.Е., Гусева А.А. Гистоморфологические особенности ускорения заживления ацетатных язв глипролинами // *Бюл. эксперимент. биол. и мед.* 2007. Т. 144. № 8. С. 226—228.
13. Kalia N., Brown N., Jacob S. et al. Studies on gastric mucosal microcirculation. The nature of regional variations induced by ethanol injury // *Gut*. 1997. Vol. 40. P. 31—35.
14. Царегородцева Т.М., Серова Т.И., Ильченко Л.Ю., Сухарева Г.В., Соколова Г.Н., Трубицына И.Е., Никольская К.А., Клишина М.В., Лазебник Л.Б. Цитокины и цитокиноterapia при заболеваниях органов пищеварения // *Терапевтический архив*. Т. 76. № 4. С. 69—72.
15. Самотруева М.А., Теплый Д.Л., Тюренков И.Н. Пути реализации нейро-иммунно-эндокринных взаимодействий // *Естественные науки*. 2009. № 4. С. 112—130.
16. Гоженко А.И., Бабий В.П., Котюжиская С.Г., Картавенко Н.П. Механизмы хемотаксиса при воспалении // *Актуальные проблемы транспортной медицины*. 2006. Т. 5. № 3. С. 56—63.
17. O'Reilly P.J., Hardison M.T., Jackson P.L., Xu X., Snelgrove R.J., Gaggari A., Galin F.S., Blalock J.E. Neutrophils contain prolyl endopeptidase and generate the chemotactic peptide, PGP, from collagen // *J. Neuroimmunol*. 2009. Vol. 217. N 1—2. P. 51—4.
18. Xu X., Jackson P.L., Tanner S., Hardison M.T., Abdul Roda M., Blalock J.E., Gaggari A. A self-propagating matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) dependent cycle of chronic neutrophilic inflammation // *PLoS One*. 2011. Vol. 6. N 1. e15781. P. 1—12.
19. Kim S.D., Lee H.Y., Shim J.W., Kim H.J., Yoo Y.H., Park J.S., Baek S.H., Zabel B.A., Bae Y.S. Activation of CXCR2 by extracellular matrix degradation product acetylated Pro-Gly-Pro has therapeutic effects against sepsis // *Am. J. Respir. Crit. Care. Med*. 2011. Vol. 184. N 2. P. 243—251.
20. Chomczynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction // *Anal. Biochem*. 1987. Vol. 162. N 1. P. 156—159.
21. Gelder C.M., Thomas P.S., Yates D.H., Adcock I.M., Morrison J.F., Barnes P.J. Cytokine expression in normal, atopic, and asthmatic subject using the combination of sputum induction and the polymerase chain reaction // *Thorax*. 1995. Vol. 50. N 10. P. 1033—1037.

22. Robert A., Olafsson A.S., Lancaster C., Zhang W.R. Interleukin-1 is cytoprotective, antisecretory, stimulates PGE2 synthesis by the stomach, and retards gastric emptying // Life Sci. 1991. Vol. 48. N 2. P. 123–34.

23. Wallace J.L., Keenan C.M., Mugridge K.G., Parente L. Reduction of the severity of experimental gastric and duo-

denal ulceration by interleukin-1 beta // Eur. J. Pharmacol. 1990. Vol. 186. N 2–3. P. 279–284.

24. Труфанова А.В., Самонина Г.Е., Каразеева Е.П. Изучение возможных противоязвенных свойств ацетил-PGP // IV Российский симпозиум “Белки и пептиды”: Сб. тез. Казань, 2009. С. 218.

Поступила в редакцию
25.04.12

EFFECTS OF GLYPROLINES (PRO-GLY-PRO (PGP) AND N-ACETYL-PGP (AC-PGP)) ON THE EXPRESSION OF CYTOKINE GENES IN THE ETHANOL ULCER FORMATION

A.D. Sangadzieva, Z.V. Bakaeva, G.E. Samonina, A.A. Guseva,
I.M. Shapoval, V.A. Osipova, M.V. Mezentseva, L.A. Andreeva

The effects of glyprolines (Pro-Gly-Pro (PGP) and N-acetyl-PGP (Ac-PGP)) on the expression of cytokine genes in the ethanol ulcer formation were investigated. Determination of the activity of mRNA in peripheral blood mononuclear cells was performed using methods of reverse transcription and polymerase chain reaction. It was shown that in control animals the formation of ethanol damages of gastric mucosa in some cases accompanied by inhibition of transcription of IFN- α , IL-6, IL-12 and TNF- α , and increase transcription of following cytokines IFN- γ , IL-8, IL-10. PGP reduced the injury area by 38%, which is accompanied by increased gene expression of IL-1 β ($p < 0,05$). The peptide Ac-PGP practically did not change the area of ethanol ulcers, but inhibited the transcription of IFN- α and TNF- α ($p < 0,05$) and IFN- γ . Thus, the gastroprotective effect of PGP probably mediated through IL-1 β .

Key words: *ulser of stomach, ethanol, glyprolines, cytokines.*

Сведения об авторах

Сангаджиева Анна Джангровна — аспирантка кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-926-832-52-40; e-mail: sanganna@mail.ru

Бакаева Занда Валериевна — канд. биол. наук, доц. кафедры фундаментальной и прикладной физиологии медико-биологического факультета РНИМУ им. Н.И. Пирогова. Тел.: 8-909-151-74-41; e-mail: bakaeva_z@mail.ru

Самонина Галина Ефимовна — докт. биол. наук., проф. вед. науч. сотр. кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-916-879-34-08; e-mail: g_samonina@mail.ru

Гусева Александра Александровна — канд. биол. наук, доц. кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-916-617-45-64; e-mail: guseva.alexandra@gmail.com

Шаповал Ирина Михайловна — канд. вет. наук, ст. науч. сотр. лаборатории микробиологии латентных инфекций, Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи Минздравсоцразвития России. Тел.: 8-925-022-90-22; e-mail: marmez@mail.ru

Осипова Валентина Александровна — лаборант-исследователь лаборатории микробиологии латентных инфекций, Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи Минздравсоцразвития России. Тел.: 8-915-054-54-33; e-mail: marmez@mail.ru

Мезенцева Марина Владимировна — докт. биол. наук., зав. лабораторией микробиологии латентных инфекций Научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи Минздравсоцразвития России. Тел.: 8-916-126-24-20; e-mail: marmez@mail.ru

Андреева Людмила Александровна — руководитель сектора регуляторных пептидов, Институт молекулярной генетики РАН. Тел.: 8-916-576-27-95; e-mail: landr@img.ras.ru