

ФИЗИОЛОГИЯ

УДК 577.112.6:616.33-002.44:612.017.1

**ВЛИЯНИЕ ГЛИПРОЛИНОВ PGP и N-acetyl-PGP
НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ ЦИТОКИНОВ
ПРИ СТРЕССОРНОМ И АЦЕТАТНОМ ЯЗВООБРАЗОВАНИИ****А.Д. Сангаджиева, З.В. Бакаева¹, Г.Е. Самонина,
М.В. Мезенцева², Л.А. Андреева³, Н.Ф. Мясоедов³***(кафедра физиологии человека и животных; e-mail: bakaeva_z@mail.ru)*

Исследовано влияние глипролинов PGP и N-acetyl-PGP на экспрессию генов цитокинов при стрессорном и ацетатном язвообразовании. Определение активности мРНК в мононуклеарах периферической крови проводили с использованием методов обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции. Интраназальное введение пептида PGP (3,7 мкмоль/кг) оказывает выраженное протекторное действие при стрессорном (59,4%) и ацетатном язвообразовании (78,5%) у крыс. N-acetyl-PGP не уменьшает площадь стрессорных повреждений, но имеет тенденцию предупреждать развитие ацетатных язв. Показано, что у контрольных животных образование стрессорных повреждений слизистой оболочки желудка в ряде случаев сопровождается повышением транскрипции ФНО α и угнетением транскрипции ИЛ-4. Развитие ацетатных язв сопровождается снижением экспрессии генов ряда цитокинов: ИФН α , ИФН γ , ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-12 и ФНО α . Протекторный противоязвенный эффект PGP сопровождается повышенной транскрипцией ИЛ-6. На фоне N-acetyl-PGP происходит нарастание экспрессии генов цитокинов Th-1 и 2 типа: ИФН α , ИФН γ и ИЛ-4.

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

В основе нарушения целостности слизистой оболочки желудка (СОЖ) лежат различные механизмы ulcerогенеза, которые в разной степени проявляются при различных моделях язвообразования.

При стрессе главную роль играют центральные механизмы. Стресс вызывает гиперактивацию симпатической нервной системы, что сопровождается временным уменьшением как агрессивных, так и защитных факторов гомеостаза СОЖ. Возникающие при этом повреждения имеют вид точечных кровоизлияний, которые в литературе рассматриваются как стрессорные язвы. Нарушение гомеостаза СОЖ при стрессе связано с уменьшением кровотока, повышением кислой секреции, повышением проницаемости сосудов желудка и снижением числа тучных клеток [1–3].

В отличие от стрессорных и этаноловых язв, которые относительно быстро развиваются и регенерируют, ацетатная язва по методу Окабе [4] по своим гистоморфологическим и временным характеристикам аналогична хроническим язвам у человека. Хорошо выраженный кратер, иногда с прободением в брюшную полость, формируется к четвертому дню после ulcerогенеза. Такие глубокие повреждения связаны прежде всего с нарушением локального кровото-

ка в области аппликации кислоты, уменьшением числа тучных клеток в СОЖ в течение 24 ч. В процессе заживления значительно увеличивается число тучных клеток, превышая контрольный уровень в 2–7,7 раза. Тучные клетки оказывают большую роль в развитии и заживлении укусно-кислых язв [5].

Важную роль в развитии воспалительных процессов играют цитокины, обеспечивающие передачу сигнала между разными видами клеток как в физиологических условиях, так и при действии различных патогенных факторов [6]. Цитокины синтезируются иммунокомпетентными клетками организма. В норме цитокины продуцируются в минимальных количествах, достаточных для проявления биологического эффекта; при различных патологиях их содержание многократно возрастает [7].

Было показано, что глипролины (PGP, PG, GP и др.), являющиеся фрагментами коллагена и эластина, повышают устойчивость слизистой оболочки желудка к действию различных ulcerогенных факторов. Противоязвенные эффекты глипролинов были показаны на разных моделях язвообразования при их внутрибрюшинном и внутрижелудочном введениях [8]. В данном исследовании мы изучили влияние пептидов PGP и N-acetyl-PGP при интраназальном введе-

¹ ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России.

² ФГБУ НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского Минздрава России.

³ Институт молекулярной генетики РАН.

нии на устойчивость СОЖ к действию водоиммерсионного стресса и ледяной уксусной кислоты. Протекторные противоязвенные свойства сопоставили с экспрессией генов цитокинов в СОЖ.

Задачей нашего исследования было изучение изменения синтеза цитокинов на уровне транскрипции, а не на уровне продукции, который обычно изучается большинством авторов. Нарушение синтеза цитокинов на уровне экспрессии их генов исследовано недостаточно и представляет научный и практический интерес, так как разные лекарственные средства действуют на разных этапах синтеза цитокинов.

Материалы и методы

За сутки до проведения эксперимента животных подвергали 18-часовой пищевой и питьевой депривации. Стрессорные язвы желудка вызывали у крыс линии Вистар плаванием в воде (21–22 °С) в течение 30 мин.

Ацетатную язву у белых беспородных крыс вызывали кратковременной аппликацией ледяной уксусной кислоты на серозную оболочку желудка по методу Окабе [4] с небольшими модификациями [9].

Животные были разделены на 3 группы: контрольная и две опытные. Исследуемые пептиды PGP и N-acetyl-PGP, синтезированные в Институте молекулярной генетики РАН, вводили интраназально в дозе 3,7 мкмоль/кг в объеме 10 мкл/200 г веса животного за час до стресса или один раз в день в течение 3 дней после аппликации. Во всех экспериментах животные контрольной группы получали со-

ответствующие объемы физиологического раствора. Непосредственно перед опытом пептиды растворяли в физиологическом растворе. Эвтаназию осуществляли через час после окончания действия стрессорного фактора и на 4-й день после аппликации ледяной уксусной кислоты. Площадь язвенных повреждений СОЖ измеряли под окуляр-микрометром в мм². Противоязвенный эффект оценивали по отношению средней площади повреждений у опытных животных к площади повреждений у контрольных и выражали в процентах.

Оценку цитокинового профиля определяли по наличию мРНК 9 цитокинов (интерферон (ИФН) α , ИФН γ , интерлейкин (ИЛ)-2, ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10, ИЛ-12 и фактор некроза опухоли (ФНО) α в мононуклеарных клетках периферической крови. Кровь брали из яремной вены. Экспрессию генов цитокинов определяли скрининговым методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции с качественной детекцией (ОТ-ПЦР). 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" (G 1758). Специфические праймеры выбирали при помощи общедоступной базы RTPrimerDB (таблица). Выделение РНК проводили по методике P. Chomczynsky, N. Sacchi [10] методом кислой гуанидин тиоцианат-фенол-хлороформ экстракции. ОТ-ПЦР были выполнены в соответствии с методикой, предложенной Gelder [11].

По степени свечения ПЦР продуктов оценивали наличие, отсутствие и низкую экспрессию мРНК.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием непараметрических критериев Манна–Уитни и Вилкоксона. Эксперименты проводили в соответствии с нормативными документами, рекомендованными Европейским научным фондом (ESF) и декларацией о гуманном отношении к животным.

Результаты исследований

Стресс вызывал повреждения СОЖ, площадь которых составила в среднем $1,01 \pm 0,16$ мм², $n = 13$ (рис. 1). PGP уменьшал площадь повреждений до $0,41 \pm 0,08$ мм², $n = 12$. В группе n-acetyl-PGP площадь стрессорных язв составила в среднем $1,04 \pm 0,19$ мм², $n = 13$ (рис. 1, А). Площадь ацетатных язв в контроле была равна в среднем $43,64 \pm 17,01$ мм², $n = 9$ мм². PGP уменьшал тяжесть повреждений СОЖ до $9,39 \pm 3,43$ мм², $n = 9$ мм². N-acetyl-PGP проявил только тенденцию к уменьшению размера язв до $22,38 \pm 9,20$ мм², $n = 8$ мм² (рис. 1, Б).

Исследование цитокинового профиля у животных через 1 ч после стресса показало, что пла-

Олигонуклеотидные последовательности праймеров базы RTPrimerDB

Праймеры	Последовательность нуклеотидов
β -актин	5' GTG GGG CGC CCC AGG CAC CA 3' CTC CTT AAT GTC ACG CAC GAT TTC
ИФН α (интерферон α)	5' TCC ATG AGA GAT TCC AGC AG 3' ATT TCT CGC TCT GAC AAC CTC CC
ИФН γ (интерферон γ)	5' AGT TAT ATC TTG GTC TTT CA 3' ACC GAA TAA TTA GTC AGC TT
ИЛ-2	5' ACT CAC CAG GAT GCT CAC AT 3' AGG TAA TCC ATC TGT TCA GA
ИЛ-4	5' CTT CCC CCT CTG TTC TTC CT 3' TTC CTG TCG AGC CGT TTC AG
ИЛ-6	5' ATG TAG CCG CCC CAC ACA GA 3' CAT CCA TCT TTT TCA GCC AT
ИЛ-8	5' TTG GCA GCC TTC CTG ATT TCT 3' TTT CCT TGG GGT CCA GAC AGA
ИЛ-10	5' ATG CCC CAA GCT GAG AAC CAA GAC CCA 3' TCT CAA GGG GCT GGG TCA GCT ATC CCA
ИЛ-12	5' CCT CAG TTT GGC CAG AAA CC 3' GGT CTT TCT GGA GGC CAG GC
ФНО α	5' TCT CGA ACC CCG AGT GAC AA 3' TAT CTC TCA GCT CCA CAC CA

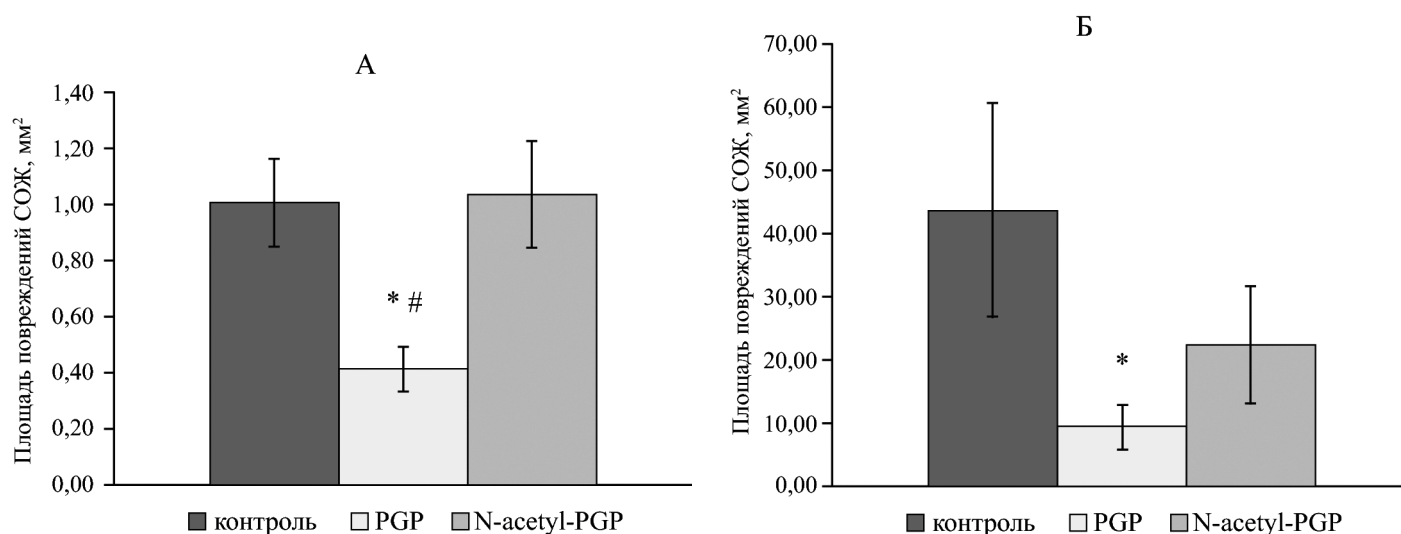


Рис. 1. А — площадь повреждения СОЖ после стресса у крыс линии Вистар (* $p < 0,05$ к контролю, # $p < 0,05$ к N-acetylPGP), Б — площадь повреждения СОЖ после аппликации ледяной уксусной кислоты у белых беспородных крыс (* $p < 0,05$ к контролю)

вание не вызывало достоверно значимых изменений экспрессии генов цитокинов в контрольной группе. Однако в ряде случаев это сопровождалось увеличением числа животных, у которых была выявлена активация экспрессии ФНО α и угнетение транскрипции следующих цитокинов: ИФН α , ИЛ-4 (рис. 2, А).

Через 1 ч после стресса на фоне действия PGP происходило угнетение экспрессии ИФН α , ИЛ-4 и активация транскрипции гена ИЛ-6, ФНО α (рис. 2, Б).

Было отмечено (рис. 2, В), что у крыс, получивших N-acetyl-PGP, увеличивалось число животных с экспрессией генов ИФН α , ИФН γ , ИЛ-4, -6, -8 и ФНО α .

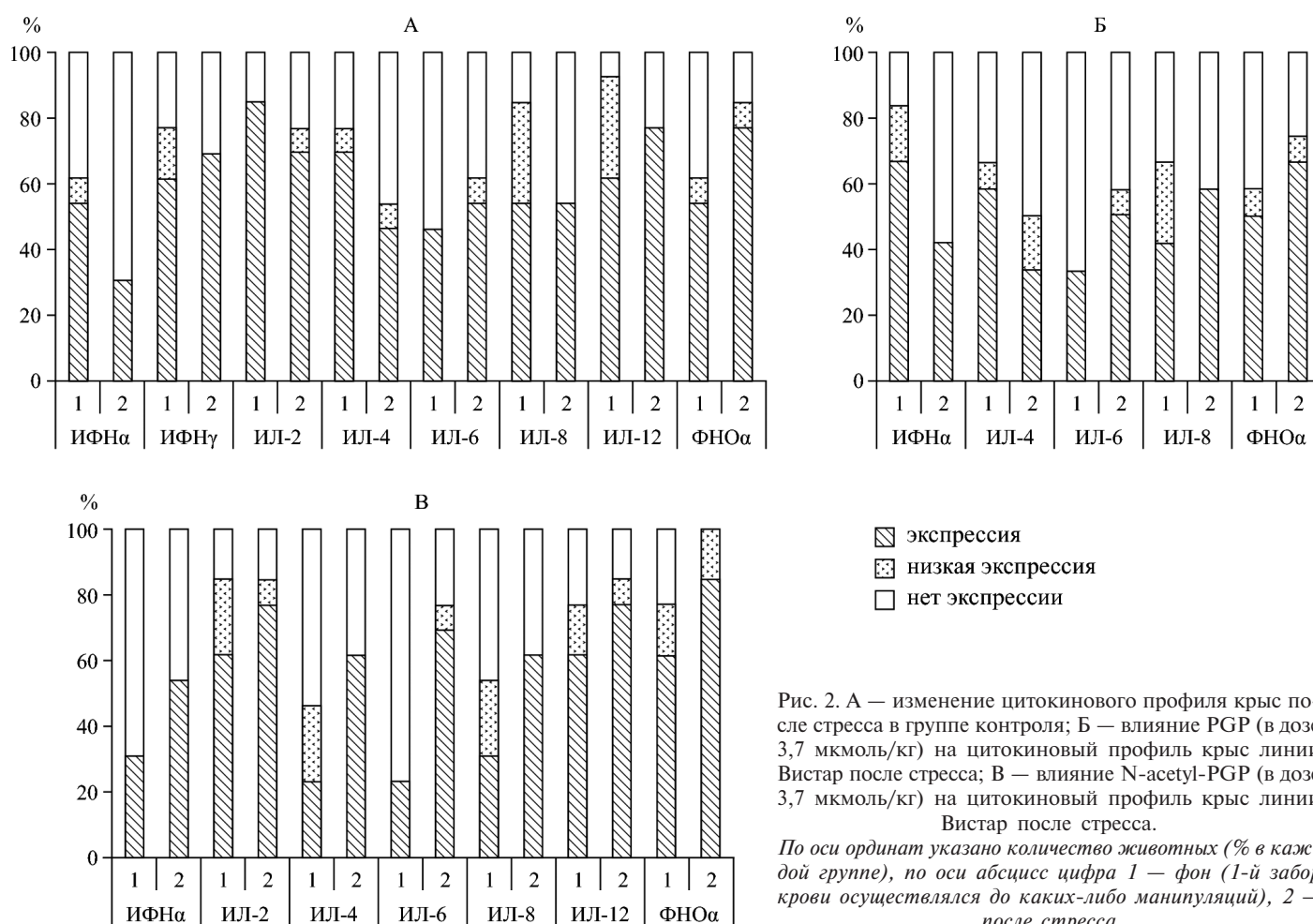


Рис. 2. А — изменение цитокинового профиля крыс после стресса в группе контроля; Б — влияние PGP (в дозе 3,7 мкмоль/кг) на цитокиновый профиль крыс линии Вистар после стресса; В — влияние N-acetyl-PGP (в дозе 3,7 мкмоль/кг) на цитокиновый профиль крыс линии Вистар после стресса.

По оси ординат указано количество животных (% в каждой группе), по оси абсцисс цифра 1 — фон (1-й забор крови осуществлялся до каких-либо манипуляций), 2 — после стресса

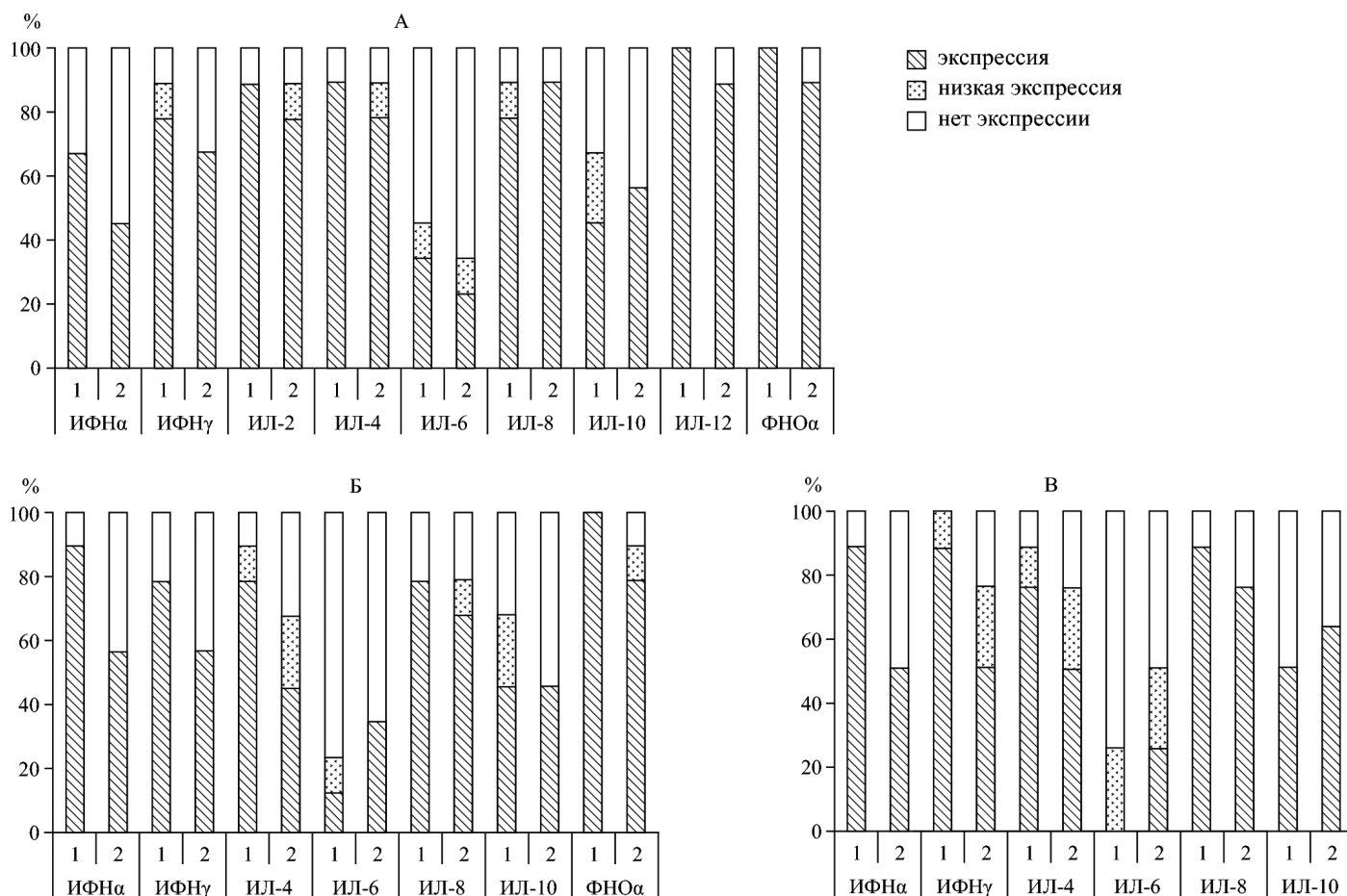


Рис. 3. А — изменение цитокинового профиля беспородных крыс после ацетатного язвобразования в группе контроля; Б — изменение цитокинового профиля беспородных крыс после ацетатного язвобразования в группе PGR (в дозе 3,7 мкмоль/кг); В — изменение цитокинового профиля беспородных крыс после ацетатного язвобразования в группе N-acetyl-PGR (в дозе 3,7 мкмоль/кг).

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 — на 4-й день после аппликации уксусной кислоты

Ацетатное язвобразование на 4-й день в группе контроля сопровождалось изменением числа животных, у которых наблюдалось угнетение транскрипции практически всех цитокинов, за исключением ИЛ-8. У 90% животных наблюдалась экспрессия гена ИЛ-8 (рис. 3, А).

Цитокиновый профиль на фоне PGR и N-acetyl-PGR практически не отличался от контроля. Однако в опытных группах было больше животных с экспрессией гена ИЛ-6 и, наоборот, меньше с ИЛ-8 (рис. 3, Б, В).

Обсуждение результатов

Таким образом, было выявлено, что интраназальное введение пептида PGR (в дозе 3,7 мкмоль/кг) оказывает протекторное действие при стрессорном на 59,4% и ацетатном язвобразовании на 78,5% у крыс.

Водоиммерсионный стресс у контрольных животных снижает экспрессию гена ИФН α , который имеет регуляторную противовирусную значимость, а также уровень противовоспалительного ИЛ-4. При воздействии стрессогенного фактора повышается транскрип-

ция ФНО α , что согласуется с литературными данными [12, 13].

Можно предположить, что введение пептида PGR приводит к выраженной активации моноцитарно-макрофагального звена иммунитета (повышение экспрессии ИЛ-6), а введение пептида N-acetyl-PGR также и Т-хелперов (Тх) 1 и 2 типа (увеличение экспрессии генов ИФН α , ИФН γ , ИЛ-4). Данное предположение требует дальнейшего экспериментального подтверждения с определением продукции цитокинов. Постстрессорные изменения уровня транскрипции ФНО α несколько отличаются у крыс, получавших разные пептиды. На фоне противоязвенного эффекта PGR экспрессия гена ФНО α увеличивалась незначительно по сравнению с контролем и группой N-acetyl-PGR.

Аппликация ледяной уксусной кислоты на серозную оболочку желудка вызывает значительное снижение экспрессии ИФН α , ИФН γ , ИЛ-2, 4, 6, 12 и ФНО α . Изменение функционирования системы интерферона, который осуществляет в организме полифункциональное действие, в том числе подавляет пролиферацию клеток, может быть оправданной мерой в случае нарушения целостности ткани, однако длительная им-

муносупрессия может стать причиной усугубления тяжести и хронизации язвенного заболевания.

Интересно, что неизменным остается влияние глипролинов на экспрессию гена ИЛ-6. Они однозначно увеличивают его транскрипцию при стрессорном и ацетатном язвообразовании, что, конечно, не может являться гарантией увеличения его продукции и требует дальнейшего экспериментального подтверждения. Исследования последних лет показали, что содержание ИЛ-6 в крови повышается при заболеваниях с выраженным воспалительным компонентом. Данный факт позволяет рассматривать этот цитокин в качестве маркера агрессивности течения заболевания [14]. Однако он оказывает разнообразное и очень существенное влияние на многие органы и системы организма: кровь, печень, обмен веществ, иммунную и эндокринную системы. В частности, ИЛ-6 подавляет секрецию ФНО α и ИЛ-1 β [15], активирует продукцию печенью белков острой фазы воспаления [16] и стимулирует гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковую систему [17], что способствует регуляции воспалительного процесса. В этом смысле ИЛ-6 можно рассматривать и как провоспалительный, и как противовоспалительный цитокин.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Glavin G.B., Szabo S. Experimental gastric mucosal injury: laboratory models reveal mechanisms of pathogenesis and new therapeutic strategies // *FASEB J.* 1992. Vol. 6. N 3. P. 825–831.
2. Mayer E.A. The neurobiology of stress and gastrointestinal disease // *Gut.* 2000. Vol. 47. N 6. P. 861–869.
3. Филаретова Л.П. Стресс и язвообразование в желудке: гастропротективная роль глюкокортикоидных гормонов // *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова.* 2009. Т. 95. № 10. С. 1160–1170.
4. Okabe S., Roth J.L.A., Pfeiffer C.J. A method for experimental, penetration gastric and duodenal ulcer in rat. Observation on normal healing // *Amer. J. of Digestive disease.* 1971. Vol. 16. N 3. P. 277–284.
5. Nakajima S., Arizono N., Hattori T., Bamba T. Increase in mucosal and connective tissue-type mast cells in the stomach with acetic acid-induced ulcer in rat // *APMIS.* 1996. Vol. 104. N 1. P. 19–29.
6. Arakawa T., Watanabe T., Tanigawa T., Tominaga K., Fujiwara Y., Morimoto K. Quality of ulcer healing in gastrointestinal tract: its pathophysiology and clinical relevance // *World J. Gastroenterol.* 2012. Vol. 18. N 35. P. 4811–4822.
7. Stanley A.C., Lacy P. Pathways for cytokine secretion // *Physiology (Bethesda).* 2010. Vol. 25. N 4. P. 218–229.
8. Самонина Г.Е., Копылова Г.Н., Умарова Б.А., Бакаева З.В., Мезенцева М.В. Некоторые механизмы противовоспалительных эффектов глипролинов // *Вопр. биол., мед. и фарм. химии.* 2011. № 4. С. 58–64.
9. Бакаева З.В., Самонина Г.Е. Глипролины уменьшают развитие и ускоряют заживление ацетатных язв у крыс // *Патофизиол. и эксперимент. терапия.* 2005. № 2. С. 25–26.

Выводы

1. Интраназальное введение пептида PGP (3,7 мкмоль/кг) оказывает выраженное протекторное действие при стрессорном (59,4%) и ацетатном язвообразовании (78,5%) у крыс.
2. Ведущая роль в развитии стрессорных язв может принадлежать ФНО α . Снижение транскрипции ИЛ-4 может уменьшать противовоспалительный потенциал СОЖ при стрессе.
3. Развитие ацетатных язв сопровождается снижением числа животных с экспрессией генов ряда цитокинов: ИФН α , ИФН γ , ИЛ-2, 4, 6, 12 и ФНО α . Одновременное снижение нескольких компонентов иммунного ответа и тесно взаимодействующих с ними неспецифических факторов может влиять на выраженность воспалительного процесса и скорость репаративных функций СОЖ.
4. Протекторный противоязвенный эффект PGP наблюдается у животных с транскрипцией ИЛ-6.
5. На фоне N-acetyl-PGP происходит нарастание экспрессии генов цитокинов Tx-1 и 2 типа ИФН α , ИФН γ и ИЛ-4, однако может не гарантировать изменение их продукции.

10. 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.
11. 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.
12. Ksontini R., MacKay S.L., Moldawer L.L. Revisiting the role of tumor necrosis factor alpha and the response to surgical injury and inflammation // *Arch. Surg.* 1998. Vol. 133. N 5. P. 558–567.
13. Zelová H., Hošek J. TNF- α signalling and inflammation: interactions between old acquaintances // *Inflamm. Res.* 2013. Vol. 62. N 7. P. 641–651.
14. Papanicolaou D.A., Wilder R.L., Manolagas S.C., Chrousos G.P. The pathophysiologic roles of interleukin-6 in human disease // *Ann. Intern. Med.* 1998. Vol. 128. N 2. P. 127–137.
15. Schindler R., Mancilla J., Endres S., Ghorbani R., Clark S.C., Dinarello C.A. Correlations and interactions in the production of interleukin-6 (IL-6), IL-1, and tumor necrosis factor (TNF) in human blood mononuclear cells: IL-6 suppresses IL-1 and TNF // *Blood.* 1990. Vol. 75. P. 40–47.
16. Heinrich P.C., Castell J.V., Andus T. Interleukin-6 and the acute phase response // *Biochem J.* 1990. Vol. 265. P. 621–636.
17. Lyson K., McCann S.M. The effect of interleukin-6 on pituitary hormone release in vivo and in vitro // *Neuroendocrinology.* 1991. Vol. 54. P. 262–266.

IMPACT OF GLYPROLINES ON CYTOKINES GENE EXPRESSION IN STRESS- AND ACETATE-INDUCED EROSION OF STOMACH

*A.D. Sangadzhieva, Z.V. Bakaeva, G.E. Samonina,
M.V. Mezentseva, L.A. Andreeva, N.F. Myasoedov*

The influence glyprolines PGP and N-acetyl-PGP on gene expression of cytokines in stress-induced and acetate-induced ulceration in rats was investigated. Determination of the activity of mRNA in peripheral blood mononuclear cells was performed using methods of reverse transcription and polymerase chain reaction. Intranasal peptide PGP (3,7 $\mu\text{mol/kg}$) and has a strong protective effect in stress model (59,4%) and acetate model (78,5%) in rats. N-acetyl-PGP does not reduce the area of stress damage in gastric mucosa and has tendency to prevent the development of acetate ulcers. It is shown that in the control animals the formation of stress damage in the gastric mucosa in some cases accompanied by increased transcription of $\text{TNF}\alpha$ and inhibition of transcription of IL-4. Development acetate ulcers accompanied by a decrease of gene expression of few cytokines: $\text{IFN}\alpha$, $\text{IFN}\gamma$, IL-2, IL-4, IL-6, IL-12 and $\text{TNF}\alpha$. Protective antiulcer effect PGP followed by increased transcription of IL-6. In group of N-acetyl-PGP is an increase of expression of cytokine genes Th-1 and 2 type $\text{IFN}\alpha$, $\text{IFN}\gamma$ and IL-4.

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

Сведения об авторах

Сангаджиева Анна Джангровна — аспирант, кафедра 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

Мезенцева Марина Владимировна — докт. биол. наук, зав. лабораторией культур тканей, Федеральное государственное бюджетное учреждение Научно-исследовательский институт вирусологии имени Д.И. Иванова Минздрава 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

Мясоедов Николай Федорович — акад., докт. хим. наук, проф., заместитель директора по научной работе, Институт молекулярной генетики РАН. Тел.: 8-499-196-00-01; e-mail: nfm@img.ras.ru