

БИОГЕРОНТОЛОГИЯ

ПЕПТИДЕРГИЧЕСКАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ, КОДИРУЮЩИХ АНТИОКСИДАНТНЫЕ И ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫЕ БЕЛКИ

В.Х.Хавинсон^{1,2}, Н.С.Линькова¹, А.В.Дудков¹, В.О.Полякова¹, И.М.Кветной¹

¹Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии СЗО РАМН; ²Институт физиологии им. И.П.Павлова РАН, Санкт-Петербург

Геропротективный пептид Т-34 регулирует экспрессию мРНК различных генов. Развитие язвы желудка сопровождается морфологическими и молекулярными изменениями, в основе которых лежит изменение уровня синтеза белков антиоксидантной и противовоспалительной систем. Пептид Т-34 восстанавливает синтез указанных белков до нормального уровня, причем в основе данного эффекта лежит его способность регулировать экспрессию соответствующих генов.

Ключевые слова: геропротективный пептид, экспрессия генов, антиоксидантные белки, противовоспалительные белки

Геропротективные пептиды обладают рядом стимулирующих эффектов, проявляющихся как на уровне различных органов и систем, так и на молекулярно-генетическом уровне [1,3,5]. Показано, что пептидные препараты тимуса обладают иммуномодулирующим и противовоспалительным действием, препараты эпифиза проявляют выраженное антиоксидантное действие и применяются не только в лечении возрастной патологии, но и при различных стрессорных воздействиях на организм [4,6,10,11]. Однако механизмы антиоксидантного и противовоспалительного действия пептидных биорегуляторов на уровне генома до сих пор недостаточно изучены.

Целью данной работы являлось исследование пептидной регуляции генома в модели язвы желудка. Выбор указанной модели обусловлен тем, что язвенная болезнь сопровождается нарушением функционирования белков антиоксидантной и противовоспалительной систем организма [9].

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование проведено на самцах крыс линии Sprague-Dawley ($n=32$) массой 180-220 г, разделенных на 4 равные группы: 1-я группа — интактные

крысы, 2-я — моделирование язвы+физиологический раствор, 3-я — моделирование язвы+пептид Т-34 (Glu-Asp-Gly) и 4-я — моделирование язвы+антибиотик клацид.

Язву моделировали путем 3-кратного введения в желудок крысы через каждые 4 ч цистамина-HCl ("Aldrich", Milwaukee, WI) в дозе 25 мг/100 г массы тела. При этом язва размером 28.0 ± 3.5 мм² возникла на границе антрального и фундального отделов желудка через 12 ч после последнего введения. Одновременно с первым введением цистамина-HCl в желудок крысы вводили культуру *Helicobacter pylori* ("Curtin Matheson Scientific Inc.", штамм Sag J117, 100 микробных клеток).

Пептид Т-34 вводили подкожно в дозе 0.5 мкг в 0.5 мл физиологического раствора в течение 5 сут с момента возникновения язвы. Антибиотик клацид (Clarithromycin, "Abbott") вводили внутримышечно в дозе 10 мг в 1 мл физиологического раствора в течение 5 сут с момента возникновения язвы.

Материал для исследования брали из края язвы на 7-е сутки (для вестерн-блоттинга и ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ), а также на 7-е и 21-е сутки для морфологического исследования).

В качестве сигнальных молекул, экспрессия которых отражает биохимические нарушения в

стенке желудка и репаративные изменения при развитии язвенной деструкции, были выбраны конститутивная и индуцибельная NO-синтазы (cNOS и iNOS), белок теплового шока HSP70 и транскрипционный фактор NF-κBp65 [5,9]. Экспрессия этих факторов изучалась методом вестерн-блоттинга. Пробы подвергали электрофорезу в одномерных пластинках геля на листах из нитроцеллюлозы с диаметром пор 0.45 мкм ("Millipore") с использованием губок с абразивным покрытием ("Scotch-Brite").

Электрофоретическая камера с листом нитроцеллюлозы содержала 0.7% уксусной кислоты, градиент напряжения 6 В/см поддерживался в течение 1 ч. Листы обрабатывали 3% БСА в физиологическом растворе (0.9% NaCl/10 mM трис-HCl pH 7.4) в течение 1 ч при 40°C, затем промывали в физиологическом растворе и инкубировали с антителами ("Biorad"), вновь промывали 5 раз в течение 30 мин, затем инкубировали со вторичными антителами. Визуализацию меченых пятен проводили изотиоцианатом флюоресцеина, связанным с пероксидазой хрена (1:100, "Fluca") в течение 30 мин при комнатной температуре, затем пятна фотографировали в длинноволновом УФ-излучении с использованием желтого фильтра.

Поскольку имеются данные о том, что эффекты действия пептидных геропротекторов проявляются на уровне экспрессии генов, нами был использован метод ПЦР-РВ [2,7,8]. Экспрессию матричной РНК (мРНК) определяли для антиоксидантного фермента супероксиддисмутазы (SOD), фактора некроза опухоли TNF-α и циклооксигеназы Cox-2. ПЦР-РВ проводили в 25 мкл смеси, содержавшей буфер (40 mM Трис-HCl pH 8.0, 2.5 mM MgCl₂, 25 mM KCl); 20 фмоль ДНК; 1 ед. активированной Taq-ДНК полимеразы, по 0.5 пмоль каждого из праймеров, меченных соответствующим донорным и акцепторным флюорохромом. ПЦР-РВ проводили в ДНК-амплификаторе "iCycler iQ" ("Bio-Rad"). Денатурация двуцепочечной ДНК в 1 цикле велась при 94°C в течение 30 с, затем следовал отжиг праймеров и их удлинение в течение 10 с при 45°C с регистрацией флюоресценции, денатурация целевого продукта проводилась при 80°C в течение 10 с, количество циклов составило 25. Электрофоретический контроль продуктов ПЦР-РВ проводили в 8% ПААГ в трис-ацетатном буфере pH 7.8 в неденатурирующих условиях при градиенте напряжения 4 В на 1 см длины геля в приборе вертикального типа в течение 4 ч. Гель после окрашивания бромистым этидием фотографировали на системе "Gel Camera System" ("UVP, Inc.").

Для морфологического исследования кусочки стенки желудка из края язвы фиксировали в 10%

нейтральном формалине pH 7.2, затем обезвоживали в автоматической станции "Leica TP1020" и заливали в парафин. Парафиновые срезы толщиной 5 мкм помещали на предметные стекла, покрытые пленкой из поли-L-лизина ("Sigma"). Для обзорного изучения срезы окрашивали гематоксилином и эозином и пикрофуксином по Ван-Гизону.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Морфологическое и молекулярное исследование выявило, что патологические изменения, характеризующие развитие язвы желудка, непосредственно связаны с экспрессией белков антиоксидантной и противовоспалительной систем.

У животных 2-й группы на 7-е сутки от начала наблюдения язва оставалась таких же размеров, как и на 1-е сутки с момента индукции. Отмечался выраженный перифокальный отек, а стенки язвы были покрыты фибринозно-некротическим налетом с признаками хронического воспаления и мелкими эрозиями. На дне язвы выявлялся широкий лейкоцитарно-некротический слой, под которым располагалась грануляционная ткань с повышенным количеством тонкостенных кровеносных сосудов и преобладанием фибробластов. В более глубоких отделах грануляционной ткани выявлялись коллагеновые волокна с частично упорядоченным ходом и небольшим количеством сосудов. В подлежащем к зоне некроза и более глубоких слоях грануляционной ткани отмечалась выраженная диффузная воспалительная инфильтрация с преобладанием нейтрофилов.

На 21-е сутки эксперимента язвенные дефекты слизистой оболочки желудка во 2-й группе сохранялись (рис. 1, а). Дно язвы было покрыто тонким некротическим слоем и диффузно инфильтрировано лейкоцитами. В подлежащем слое созревающая грануляционная ткань имела частично упорядоченный ход коллагеновых волокон и умеренно выраженную воспалительную инфильтрацию гистиоцитами, лимфоцитами и нейтрофилами.

В 3-й группе (введение пептида Т-34) на 7-е сутки после индукции язвы отмечалось уменьшение не только площади язвенного дефекта, но и его глубины, а также очищение дна язвы от некротических масс и уменьшение воспаления вокруг язвы. При гистологическом исследовании язвы желудка лейкоцитарно-некротический слой был более тонким. Подлежащий слой был представлен созревающей грануляционной тканью с большим количеством сосудов и умеренно выраженной диффузной лейкоцитарной инфильтрацией преимущественно из гистиоцитов, лимфоцитов и нейтрофилов. В зоне краев язвенного дефекта

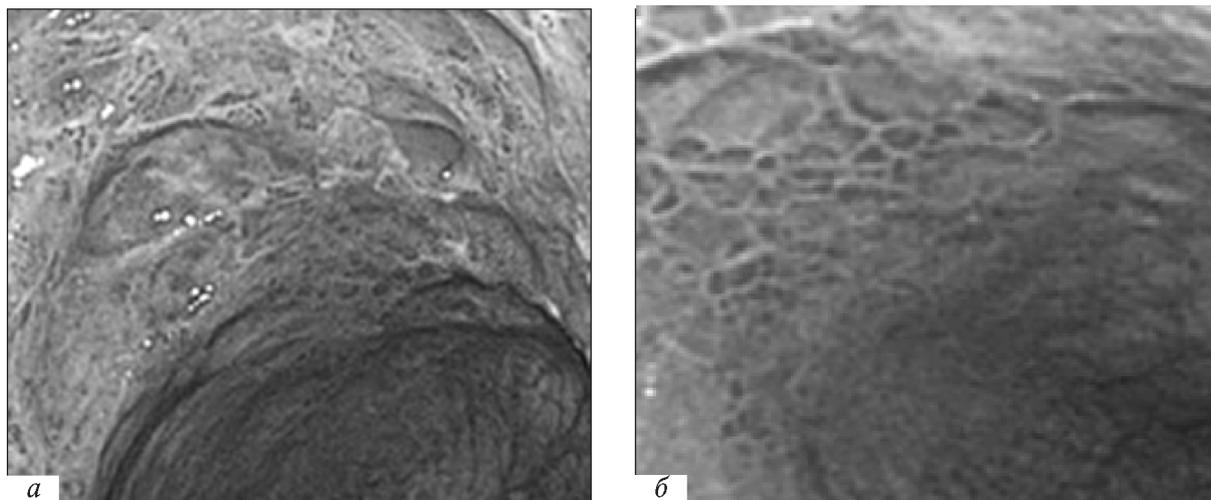


Рис. 1. Патоморфоз индуцированной язвы желудка.

а – язва на 21-е сутки без введения пептидов, *б* – полная эпителизация язвы на 21-е сутки после введения пептида Т-34.

определялись кистозно-расширенные железы с пролиферацией эпителиоцитов.

На 21-е сутки после введения пептида Т-34 язвенные дефекты не были выявлены (рис. 1, б). Слизистая оболочка желудка была равномерно эпителизирована и имела розовую окраску. Отмечалась эпителизация язвенного дефекта. В слизистой оболочке язвенных дефектов не выявлялось, обнаруживались лишь зоны, в которых определялись железистые полости, выстланные пролиферирующим эпителием. В подлежащей строме слизистой выявлялась фиброзная ткань с упорядоченным ходом коллагеновых волокон и слабо

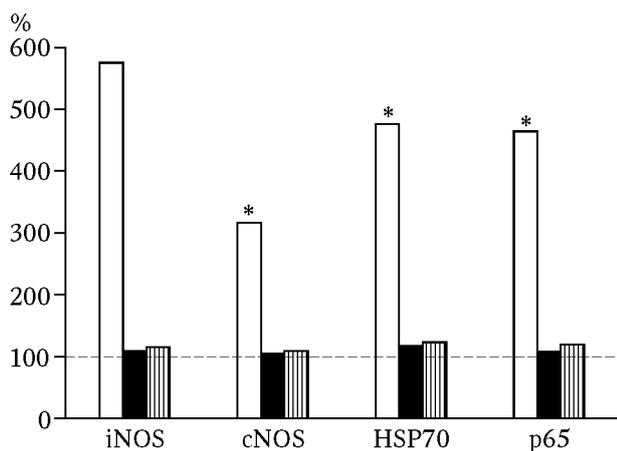


Рис. 2. Экспрессия сигнальных молекул в слизистой оболочке желудка. Уровень экспрессии выражен в % по отношению к контролю, принятому за 100% (пунктир). Светлые столбики – язва желудка (2-я группа), темные – язва желудка+пептид Т-34 (3-я группа), заштрихованные – язва желудка+клаудин (4-я группа). Здесь и на рис. 3: * $p < 0.05$ по сравнению с соответствующим показателем в контроле.

выраженной воспалительной лимфоидно-гистиоцитарной инфильтрацией. Введение антибиотика клацида (4-я группа) как на 7-е, так и на 21-е сутки эксперимента оказывало тот же эффект, что и введение пептида Т-34.

Вестерн-блоттинг показал, что экспрессия всех изученных сигнальных молекул в образцах слизистой оболочки из края язвы желудка на 7-е сутки после ее индукции достоверно возрастает в 3-5 раз по сравнению с нормальной слизистой оболочкой интактных животных (рис. 2). Усиление экспрессии обеих форм NOS, HSP70 и p65 в области язвы желудка свидетельствует об индукции синтеза провоспалительных цитокинов, усилении

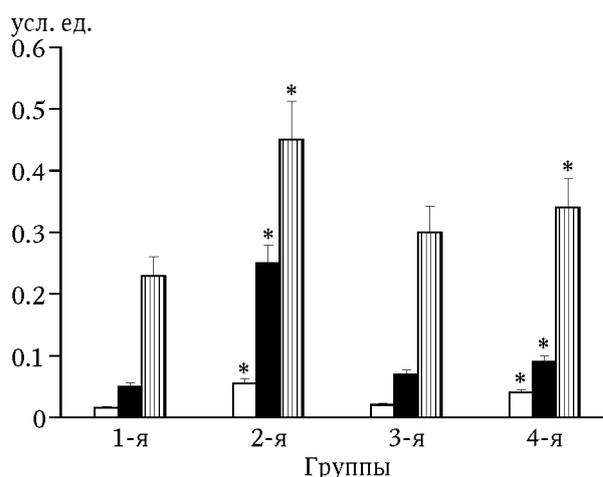


Рис. 3. Экспрессия мРНК сигнальных молекул в слизистой оболочке желудка. Значения экспрессии представлены в усл. ед., отражающих насыщенность окраски геля. Светлые столбики – TNF- α , темные – SOD, заштрихованные – Cox-2.

апоптоза и избыточном развитии свободнорадикальных реакций, что является признаком патологического процесса.

Пептид Т-34 оказывал репаративное действие на слизистую оболочку желудка, что выражалось в достоверном снижении экспрессии обеих форм NOS, HSP70 и p65 до контрольного уровня (рис. 2). Аналогичным действием обладал антибиотик клацид.

Таким образом, по данным морфологического и молекулярного исследования можно сделать вывод о том, что репаративный эффект пептида Т-34 связан с нормализацией синтеза указанных белков.

ПЦР-РВ позволила установить, что при индукции язвы на 7-е сутки в образцах слизистой оболочки из ее края относительно контроля достоверно возрастает экспрессия мРНК, кодирующей синтез SOD, TNF- α и Cox-2 (рис. 3), что свидетельствует об изменении экспрессии генов, продуктами которых являются белки, участвующие в антиоксидантной и антиапоптотической защите.

Применение пептида Т-34 приводит к снижению синтеза мРНК, продуктами которых являются SOD, TNF- α и Cox-2 до контрольного уровня, что свидетельствует о том, что в основе репаративного эффекта исследуемого пептида на язву желудка лежит его регуляция экспрессии генов, продуктами которых являются белки системы антиоксидантной защиты и воспалительной реакции.

Следует отметить, что антибиотик клацид хотя и снижал экспрессию исследуемых мРНК по сравнению со 2-й группой, однако ни один из показателей не достигал контрольных значений (рис. 3).

Репаративный эффект пептида Т-34 при его воздействии на язву желудка на генном уровне был выражен сильнее.

Таким образом, в основе механизма репаративного действия пептида Т-34 на язву желудка лежит его способность регулировать экспрессию генов, кодирующих белки системы антиоксидантной защиты и воспалительных реакций.

ЛИТЕРАТУРА

1. Трофимов А.В., Севостьянова Н.Н., Линькова Н.С. и др. // Бюл. exper. биол. 2010. Т. 150, № 12. С. 682-685.
2. Хавинсон В.Х., Федореева Л.И., Ванюшин Б.Ф. // Бюл. exper. биол. 2011. Т. 151, № 1. С. 76-81.
3. Anisimov V.N., Khavinson V.Kh. // Biogerontology. 2010. Vol. 11, N 2. P. 139-149.
4. Brzozowski T., Konturek P.C., Moran A.P. et al. // Digestion. 2003. Vol. 67, N 4. P. 195-208.
5. Khavinson V.Kh., Korneva E.A., Malinin V.V. et al. // Neuro Endocrinol. Lett. 2002. Vol. 23, N 5-6. P. 411-416.
6. Khavinson V.Kh., Malinin V.V., Timofeeva N.M. et al. // Bull. Exp. Biol. 2002. Vol. 133, N 3. P. 290-292.
7. Khavinson V.Kh., Malinin V.V. Gerontological aspects of genome peptide regulation. Basel, 2005.
8. Khavinson V., Malinin V. // J. Nutr. Health Aging. 2009. Vol. 13, N 1. P. 213.
9. Konturek P.C., Brzozowski T., Burnat G. et al. // J. Physiol. Pharmacol. 2010. Vol. 61, N 4. P. 429-436.
10. Kvetnoy I.M., Hernandez-Yago J., Hernandez J.M. et al. // Neuro Endocrinol. Lett. 2000. Vol. 21, N 2. P. 83-99.
11. Kvetnoy I.M., Poupuchiev V.V., Khavinson V.Kh., Yuzhakov V.V. // Neuroimmunomodulation. 1999. Vol. 6, N 6. P. 450.

Получено 01.07.10