

УДК 612.014

# Пептид пролил-глицил-пролин (PGR) препятствует повышению проницаемости кровеносных сосудов при воспалении

Н. С. Бондаренко<sup>1\*</sup>, А. Н. Шнейдерман<sup>2</sup>, А. А. Гусева<sup>3</sup>, Б. А. Умарова<sup>3</sup><sup>1</sup>Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, 119334, Москва, ул. Вавилова, 26<sup>2</sup>НИИ канцерогенеза Российского онкологического научного центра им. Н.Н. Блохина, 115478, Москва, Каширское ш., 24<sup>3</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, 119234, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12

\*E-mail: n.s.bondarenko@gmail.com

Поступила в редакцию 25.01.2016

Принята к печати 28.11.2016

**РЕФЕРАТ** Изучено влияние трипептида пролил-глицил-пролина (PGR) на проницаемость кровеносных сосудов крыс в условиях воспаления. Установлено, что пептид уменьшает отек лапы крыс, вызванный подкожным введением гистамина, в той же степени, что и классический противовоспалительный препарат диклофенак. Однако определение относительного уровня экспрессии гена *cox-2* в очаге воспаления с помощью ПЦР в реальном времени показало, что, в отличие от диклофенака, PGR не влиял на экспрессию гена *cox-2*. Это свидетельствует о различии механизмов их действия. На экспериментальной модели острого перитонита, вызванного внутрибрюшинной инъекцией тиогликолата, показано, что воспалительная реакция сопровождается повышением проницаемости сосудов в тканях желудка и тонкого кишечника. Предварительное (за 30 мин до индукции воспаления) введение PGR предотвращало это повышение, вследствие чего проницаемость сосудов, объем экссудата в перитонеальной полости и количество красителя Evans Blue в нем оставались на уровне контрольных значений. Таким образом, полученные нами результаты свидетельствуют, что в основе противовоспалительного действия PGR лежит его способность предотвращать повышение проницаемости кровеносных сосудов.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** пролил-глицил-пролин (PGR), воспаление, проницаемость сосудов, противовоспалительное действие.

## ВВЕДЕНИЕ

Большинство патологических процессов, происходящих в организме, сопровождается развитием воспалительной реакции. Для восстановления нарушенных функций организма важно понять роль эндогенных регуляторных систем в этом процессе. Большой интерес вызывают регуляторные пептиды, которые образуются в очаге воспаления в результате деградации белков межклеточного матрикса. К таким пептидам относится трипептид пролил-глицил-пролин (PGR) – типичный представитель семейства глипролинов [1]. К настоящему времени выявлен широкий спектр свойств этого пептида, свидетельствующих о его защитном действии при сопряженных с воспалением нарушениях различных систем организма. В частности, PGR и его метаболиты оказывали протективное и терапевтическое действие на слизистую оболочку желудка

при ulcerогенезе различной этиологии [2], уменьшали количество нейтрофилов в очаге воспаления при перитоните, вызванного внутрибрюшинным введением крысам 1% раствора уксусной кислоты [3]. На модели острого экспериментального перитонита (внутрибрюшинное введение 40% раствора тиогликолата) нами было показано, что пептид обладает выраженным противовоспалительным действием, опосредованным в определенной степени стабилизацией тучных клеток [4, 5]. Тучные клетки – источник многих вазоактивных медиаторов, вызывающих повышение проницаемости эндотелия кровеносных сосудов [6], одного из первых признаков воспалительного ответа [7]. На основании этого мы предположили, что PGR может влиять на проницаемость кровеносных сосудов и, как следствие, на формирование отека при воспалительном ответе. Выяснению этого и посвящена наша работа.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Пептид PGP был синтезирован в Институте молекулярной генетики РАН, Москва.

В работе использовали самцов белых беспородных крыс весом 180–220 г. Эксперименты выполняли в соответствии с этическими принципами и нормативными документами, рекомендованными Европейским научным фондом (ESF) и декларацией о гуманном отношении к животным.

Отек лапы у крыс вызвали подкожным введением 0.2 мг гистамина (Sigma, США) в 0.1 мл физиологического раствора. Толщину и окружность лапы измеряли каждый час в течение 4 ч.

Через 2 ч после индукции воспаления гистамином у животных под эфирным наркозом непосредственно из зоны воспаления вырезали образец ткани, который сразу же помещали в раствор RNAlater (Ambion).

РНК из образцов тканей выделяли с использованием TriReagent (Sigma, США) согласно протоколу производителя.

Для получения одноцепочечных кДНК к 2 мкг суммарной РНК, предварительно обработанной ДНКазой I (Fermentas, США) (1 ед. фермента на 1 мкг РНК), добавляли 80 пмоль произвольно выбранных 9-членных праймеров и инкубировали в течение 5 мин при 70°C. Затем в смесь на льду вносили 25 мкл RT-MIX (RT-Buf 10× (Fermentas, США)), 40 мМ dNTP, 10 ед. RNAsin (Promega, США) и инкубировали в течение 5 мин при 37°C. После этого вносили 200 ед. обратной транскриптазы M-MuLV (Fermentas, США) и проводили реакцию при 42°C в течение 1 ч. Реакцию останавливали прогреванием смеси при 70°C в течение 10 мин. Объем пробы доводили до 200 мкл деионизированной водой. Пробу хранили при –20°C.

ПЦР в реальном времени проводили с использованием амплификатора iCycler iQ5 (BioRad Laboratories GmbH, Германия). Матрицей для ПЦР служила кДНК. Реакционная смесь включала: 10 пмоль 5'- и 3'-праймеров, 1.6 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0.25 мМ dNTP, амплификационный буфер 10× с интеркалирующим флуоресцентным красителем Eva Green («Синтол», Россия), 1 ед. Taq-ДНК-полимеразы («Синтол», Россия). Реакционную смесь предварительно прогревали в течение 10 мин при 95°C и проводили 40 циклов денатурации (95°C), отжига (60°C) и полимеризации (72°C) с определением количества накопленного продукта по спектру флуоресценции в конце стадии элонгации. Каждую реакцию проводили в трех повторах. В работе использовали следующие праймеры:

*cox-2* F–5'–CCATGTCAAAACCGTGGTGAATG–3',  
*cox-2* R–5'–ATGGGAGTTGGGCAGTCATCAG–3',  
*gapdh* RN F–5'–CTGACATGCCGCCTGGAGAAA–3',

*gapdh* RN R–5'–TGGAAGAATGGGAGTTGCTGT–TGA–3'.

Ген домашнего хозяйства *gapdh* использовали в качестве референсного для выравнивания внесенного в реакцию количества транскриптов. Праймеры подбирали с помощью программы VectorNTI. Температуру отжига праймеров и количество циклов для амплификации каждого из фрагментов подбирали экспериментально. Обработку результатов эксперимента и расчет относительного уровня экспрессии проводили с помощью программ Bio-Rad iQ5 2.0 Standard Edition Optical System Software и REST 2005. Коэффициент эффективности реакции рассчитывали с использованием программы LinRegPCR.

Острый экспериментальный перитонит у крыс вызывали внутрибрюшинным введением 40% раствора тиогликолата (Fluka, Швейцария) в дозе 4 г/кг, и определяли проницаемость кровеносных сосудов желудка и тонкого кишечника. Для этого краситель Evans blue (Sigma, США) вводили шприцем (50 мг/кг) в яремную вену. Через 15 мин животных наркотизировали, вскрывали и отбирали образцы экссудата. Затем животных транскардиально перфузировали в течение 2–3 мин физиологическим раствором, содержащим 20 ед./мл гепарина. Выделяли желудок и тонкий кишечник, измельчали и взвешивали. Для экстракции красителя ткани заливали формидом (Scharlau Chemie S.A.) и инкубировали в течение 48 ч при 37°C. Затем пробы центрифугировали в течение 15 мин при 2000 об/мин. Количество красителя определяли на спектрофотометре Multiscan EX (Thermo Scientific) при λ = 620 нм и выражали в мкг/г ткани и в мкг/мл экссудата.

Результаты обрабатывали статистически с помощью непараметрического критерия Манна–Уитни в компьютерной программе STATISTICA 6. Критической величиной значимости считали 0.05.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В первой серии экспериментов для формирования отека животным подкожно вводили в лапу 0.2 мг гистамина в объеме 100 мкл. За 30 мин до индукции воспаления в ту же лапу внутримышечно вводили PGP в дозе 3.7 мкмоль/кг. Другой группе опытных животных вводили диклофенак 1 мг/кг (Nemopharm, Сербия). Контрольным животным вместо пептида вводили физиологический раствор. Измеряли толщину и окружность лапы и выражали в процентах от исходных значений (до введения препарата). Результаты представлены на *рис. 1*.

Толщина и окружность лапы через 30 мин после введения гистамина увеличивались в среднем на 20.5%. После предварительного введения пептида отек лапы был значительно меньше, уже через 1 ч

окружность лапы уменьшилась на 29.5% по сравнению с контролем, а через 2 и 3 ч – на 38 и 47% соответственно. Через 2 ч после индукции воспаления толщина лапы была на 38% меньше, чем в контроле, а через 3 ч на 35%.

Таким образом, предварительное введение PGP приводило к уменьшению отека. Это подтверждает выявленное ранее противовоспалительное действие пептида. Сравнение эффектов PGP и нестероидного противовоспалительного препарата диклофенак (рис. 1) показало, что пептид и диклофенак действовали однонаправленно – уменьшали отек, вызванный гистамином. Это наводит на мысль о возможном сходстве механизмов их действия. Известно, что диклофенак подавляет циклооксигеназу-2 (COX-2) – один из основных ферментов в цепи синтеза простагландинов из арахидоновой кислоты. Поэтому в следующей серии экспериментов мы исследовали влияние PGP на экспрессию гена *cox-2* при воспалении, вызванном подкожным введением гистамина в лапу. Полученные результаты представлены на рис. 2.

Подкожное введение гистамина практически в 5 раз увеличивало экспрессию гена *cox-2* через 2 ч после начала воспаления. Предварительное введение диклофенака приводило к снижению уровня экспрессии исследуемого гена на 31%. Однако при введении пептида уровень экспрессии гена не изменялся и оставался таким же, как при воспалении. Это свидетельствует о различиях в механизмах противовоспалительного действия PGP и диклофенака.

Поскольку формирование отека обусловлено повышением проницаемости эндотелия сосудов, мы оценили влияние PGP на изменение проницаемости кровеносных сосудов в желудке и тонком кишечнике при остром перитоните у крыс.

Животным опытной группы за 15 мин до внутрибрюшинного введения тиогликолата внутримышечно вводили PGP в дозе 3.7 мкмоль/кг. Животные другой группы вместо PGP получали физиологический раствор. Третьей группе животных вводили физиологический раствор без последующей индукции воспаления. Об уровне проницаемости судили по количеству красителя Evans blue в экссудате и образцах тканей желудка и кишечника.

Полученные результаты представлены на рис. 3. Видно, что проницаемость в контроле (5.9 мкг краски на 1 г ткани в желудке и 3.7 мкг/г в тканях тонкого кишечника (рис. 3А)) существенно отличается от проницаемости при воспалении. Проницаемость кровеносных сосудов в желудке увеличивалась в среднем на 66%, а в кишечнике – в 2.4 раза. Предварительное введение пептида не приводило к повышению проницаемости в желудке и кишечнике. Повышенный уровень проницаемости после

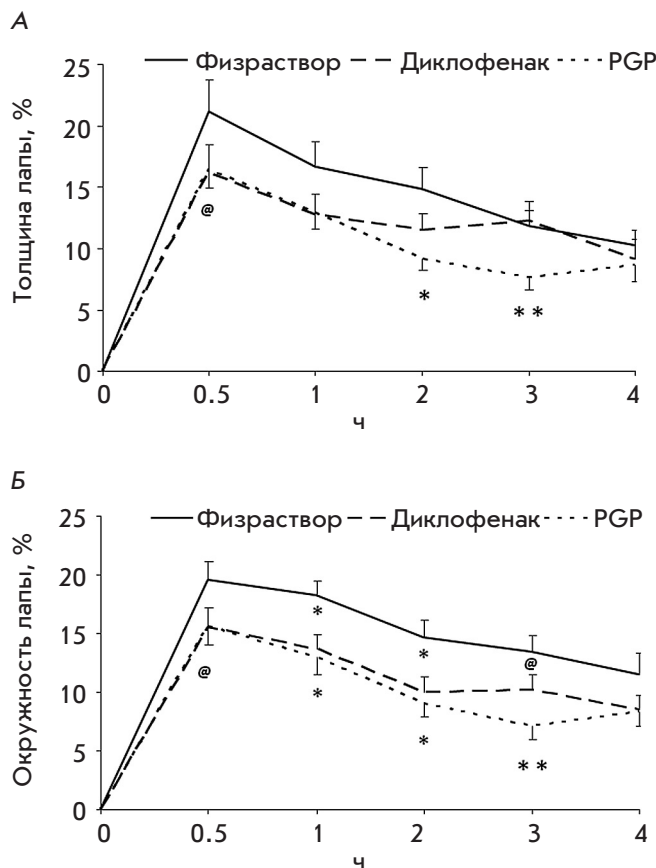


Рис. 1. Влияние PGP и диклофенака на изменение толщины (А) и окружности (Б) лапы при воспалении, вызванном гистамином.

\* –  $p < 0.05$ , \*\* –  $p < 0.01$ , @ –  $p < 0.1$

введения тиогликолата, как и эффект от введения пептида, сохранялся в течение 2 ч.

Кроме того, о снижении проницаемости сосудов свидетельствует уменьшение количества экссудата в перитонеальной полости на 14% и количества красителя в экссудате (мкг/мл) практически в 2 раза (рис. 3Б,В).

Таким образом, предварительное введение PGP предотвращает повышение проницаемости сосудов в желудке и тонком кишечнике. Объем экссудата и количество красителя в нем также остаются на уровне контрольных значений.

Способность PGP препятствовать увеличению проницаемости сосудистого эндотелия может быть связана как с прямым действием пептида на сосуды [8], так и с его стабилизирующим действием на тучные клетки [9], медиаторы которых, как известно, вносят большой вклад в инициацию и регуляцию

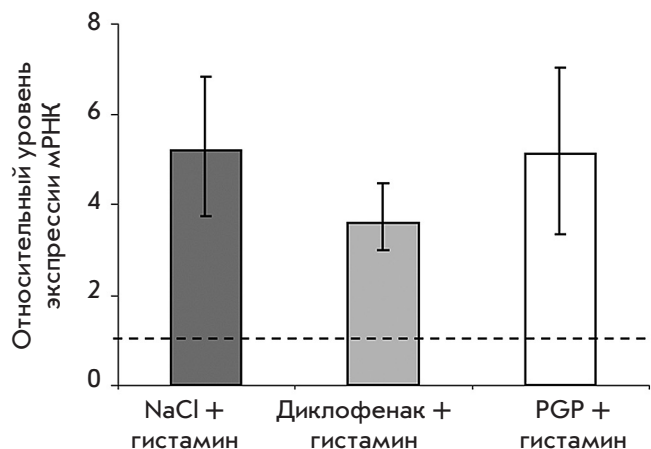


Рис. 2. Уровень экспрессии мРНК циклооксигеназы-2. Пунктирной линией обозначен уровень экспрессии в норме

проницаемости сосудов. В ходе наших экспериментов установлено, что пептид нельзя рассматривать как классический противовоспалительный препарат, такой, как диклофенак, поскольку, несмотря на внешнее сходство наблюдаемых эффектов, механизмы их действия различаются.

Сведения об участии PGP в регуляции воспалительного процесса противоречивы. С одной стороны, достоверно установлено защитное действие глипролинов при различных нарушениях, сопряженных с воспалением. Так, они не только оказывают протекторное действие на слизистую оболочку желудка при образовании язвы, но и защищают клетки от окислительного стресса и участвуют в регуляции иммунного статуса организма [10].

С другой стороны, PGP и его ацетилированная по N-концу форма (N-АсPGP) являются хемоаттрактантами для нейтрофилов [11]. Реализация этой активности опосредована взаимодействием с рецепторами CXCR2 нейтрофилов. Эти пептиды привлекают нейтрофилы в очаг воспаления и тем самым пролонгируют процесс. Вместе с тем, рецепторы CXCR2 обладают селективностью по отношению к лигандам, что может приводить к запуску сигнальных каскадов, направленных как на усиление, так и на ограничение воспаления [12]. Кроме того, в последнее время появились данные о том, что связывание N-АсPGP с рецепторами CXCR2 нейтрофилов, моноцитов и макрофагов способствует проявлению терапевтического эффекта данного пептида при сепсисе. Установлено, что введение мышам N-АсPGP приводило к увеличению продукции интерферона- $\gamma$  и интерлейкина (IL)-12, а также к ингибированию

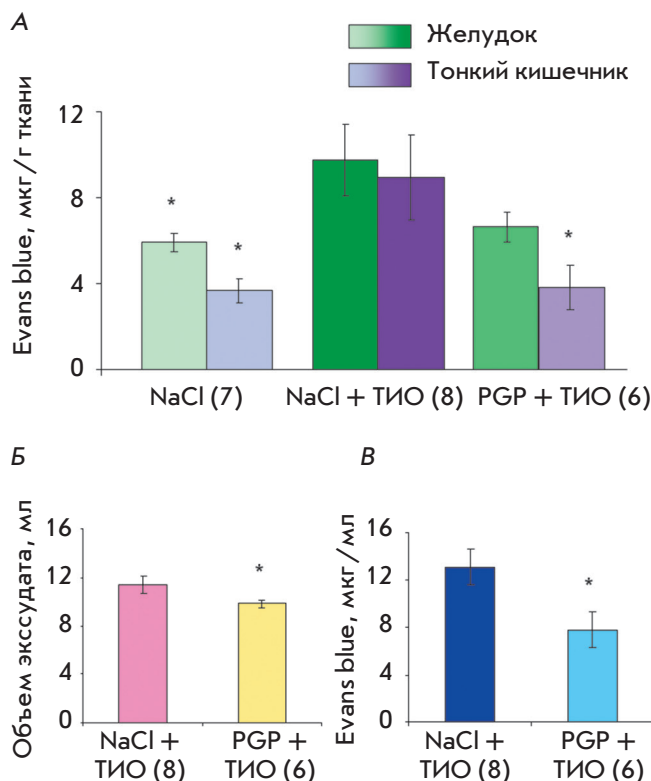


Рис. 3. Изменение проницаемости сосудов желудка и тонкого кишечника (А), объема перитонеального экссудата (Б) и количества красителя в экссудате (В) при экспериментальном остром перитоните у крыс через 30 мин после введения тиогликолата. \* –  $p < 0.05$ . ТИО – тиогликолат. Цифрами в скобках указано количество животных в каждой группе

продукции провоспалительных цитокинов (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  и IL-6) в перитонеальной жидкости. *In vitro* N-АсPGP непосредственно увеличивал продукцию интерферона- $\gamma$  и снижал стимулированную липополисахаридами продукцию TNF- $\alpha$  макрофагами селезенки мыши и лейкоцитами человека [12]. Эти данные свидетельствуют о том, что наличие у пептидов хемоаттрактантной активности не отрицает их способности в определенных условиях проявлять противовоспалительные свойства.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Совокупность полученных нами данных позволяет считать, что в основе противовоспалительного действия пептида наряду со стабилизацией тучных клеток лежит его способность предотвращать повышение проницаемости кровеносных сосудов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ашмарин И.П., Каразеева Е.П., Ляпина Л.А., Самонина Г.Е. // Биохимия. 1998. Т. 63. № 2. С. 149–155.
2. Ашмарин И.П., Самонина Г.Е., Бадмаева К.Е., Бакаева З.В., Васильковский Б.В., Золотарев Ю.А. // Успехи физиол. наук. 2006. Т. 37. № 2. С. 11–18.
3. Бакаева З.В., Самонина Г.Е., Умарова Б.А., Копылова Г.Н., Гончарова Е.Л., Багликова К.Е. // Цитокины и воспаление. 2008. Т. 7. № 2. С. 28–32.
4. Умарова Б.А., Лелекова Т.В., Копылова Г.Н., Самонина Г.Е., Бакаева З.В., Гончарова Е.Л., Бондаренко Н.С. // Цитокины и воспаление. 2009. Т. 8. № 3. С. 44–47.
5. Умарова Б.А., Бондаренко Н.С., Копылова Г.Н., Самонина Г.Е. // Биол. мембраны. 2011. Т. 28. № 4. С. 262–266.
6. Kumar P., Shen Q., Pivetti C.D., Lee E.S., Wu M.H., Yuan S.Y. // Expert Rev. Mol. Med. 2009. V. 11. P. e19.
7. Kunder C.A., St John A.L., Abraham S.N. // Blood. 2011. V. 118. № 20. P. 5383–5393.
8. Бакаева З.В., Бадмаева К.Е., Сергеев И.Ю., Самонина Г.Е. // Бюл. эксп. биол. мед. 2003. Т. 135. № 4. С. 390–393.
9. Bondarenko N.S., Yusipovich A.I., Kovalenko S.S., Kopylova G.N., Umarova B.A., Graevskaya E.E., Maksimov G.V. // Biologicheskie Membrany. 2013. V. 30. № 3. P. 199–205.
10. Andreeva L.A., Mezentseva M.V., Nagaev I.Y., Shapoval I.M., Shcherbenko V.E., Potapova L.A., Russu L.I., Narovlyansky A.N., Ershov F.I., Myasoedov N.F. // Dokl. Bio. Sci. 2010. V. 434. P. 300–303.
11. Haddox J.L. Pfister R.R., Sommers C.I., Blalock J.E., Villain M. // Investigative Ophthalmol. Visual Sci. 1999. V. 40. № 10. P. 2427–2429.
12. Kim S.D., Lee H.Y., Shim J.W., Kim H.J., Yoo Y.H., Park J.S., Bae Y.-S. // Am. J. Respiratory Crit. Care Med. 2011. V. 184. № 2. P. 243–251.