

носіїв Ala12 варіанту гена PPARG з гомозиготами Pro12 було продемонстровано, що зв'язок алеля Ala12 з підвищенням глікемічного контролю був більш вираженим.

Ключові слова: інсулінорезистентність, неалкогольна жирова хвороба печінки, ферменти печінки, ліпіди, розиглітазон, поліморфізм гена PPARG.

Резюме

Степанова Е.В. *Эффективность розиглитазона в коррекции инсулинорезистентности в зависимости от Pro12Ala полиморфизма гена PPARG.*

Неалкогольная жировая болезнь печени (НАЖБП) тесно связана с инсулинорезистентностью (ИР), дислипидемией, ожирением и является сердечнососудистым фактором риска. После 6 месяцев терапии розиглитазоном у лиц с ИР была отмечена его эффективность в снижении уровня HbA1c, коррекции уровня липидов плазмы крови и ферментов печени. Экспериментальными исследованиями было доказано, что вариант Pro12 гена PPARG, по сравнению с вариантом Ala12, имеет более низкую аффинность к PPAR-ответственному элементу и сниженную активность PPARγ в ответ на лиганды. Исследовалась связь полиморфизма Pro12Ala гена PPARG с метаболическими особенностями и риском / развитием диабета. Сравнением носителей Ala12 варианта гена PPARG с гомозиготами Pro12 было продемонстрировано, что связь алеля Ala12 с повышением гликемического контроля была более выраженной.

Ключевые слова: инсулинорезистентность, неалкогольная жировая болезнь печени, ферменты печени, липиды, розиглитазон, полиморфизм гена PPARG.

Summary

Stepanova H.V. *Rosiglitazone effect in correction insulin resistens on depend of pparg gene Pro12Ala polymorphism.*

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is strongly associated with IR, dyslipidemia, obesity and are risk factors for the development cardiovascular disease. After 6 months' treatment rosiglitazone is as effective in lowering HbA1c, correction of lipid levels on plasma blood and of liver enzymes in people with insulin resistence. In experiments have demonstrated that, compared to the PPARG Pro12 variant, the Ala12 variant has lower binding affinity for a PPAR responsive element and decreased PPARγ-activation in response to ligands. The association of the PPARG Pro12Ala polymorphism with metabolic traits and the risk/development of DM has been investigated. When PPARG Ala12 allele carriers were compared to PPARG Pro12 homozygotes, the association of the Ala12 allele with glycemic control was more evident.

Key words: insulin resistens, non-alcoholic fatty liver disease, liver enzymes, rosiglitazon, PPARG polymorphism.

Рецензент: д.біол.н., проф.Б.П.Романюк

УДК 616.34-002-02+616.34:611.13/14

ЕКСПРЕСІЯ РЕЦЕПТОРІВ ДО ФАКТОРУ РОСТУ КРОВОНОСНИХ СУДИН VEGFR-1 ТА VEGFR-2 ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ЗАПАЛЬНИХ ЗАХВОРЮВАННЯХ КИШЕЧНИКА

Г.М. Толстанова

Київський національний університет ім. Тараса Шевченка

Вступ

Запальні захворювання кишечника (ЗЗК), до яких належать хвороба Крона та виразковий коліт, характеризуються хронічним запаленням стінки кишечника невизначеної етіології [1]. За даними сучасної літератури ангиогенез (утворення нових кровеносних судин) є новим критичним компонентом патогенезу ЗЗК [13]. Фактор росту кровеносних судин (VEGF), а саме його ізоформа VEGF-A, є фундаментальним регулятором ангиогенезу, так як втрата єдиного алелю його гену призводить до дефектної васкуляризації та ранньої ембріональної смерті [7]. VEGF бере участь у проліферації та міграції ендотеліальних клітин [6]. З іншого боку, VEGF має про-запальні властивості за рахунок збільшення проникності кровеносних судин [4] та підвищення експресії білків адгезії лейкоцитів [14].

Ми та інші показали підвищення експресії VEGF-A протеїну та мРНК при гострій та хронічній стадіях експериментального ЗЗК та у хворих на дану патологію [3, 8, 13]. Більш того, нейтралізація його активності сприяла швидкому загоєнню уражень при експериментальному виразковому коліті [11], що свідчить про його патологічну роль в механізмах ЗЗК.

Основними рецепторами, що опосередковують біологічні функції VEGF-A є VEGFR-1 та VEGFR-2 [9]. Не дивлячись на чисельні клінічні та експериментальні дані про підвищення рівня VEGF, дані, щодо динаміки змін експресії VEGFR-1 та VEGFR-2 за різних стадій ЗЗК обмежені.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота виконана за рахунок гранту президента

України (розпорядження від 17.11.2008 р. № 319/2608-рп "Про призначення грантів Президента України для обдарованої молоді на 2009 рік").

Метою нашої роботи було порівняти зміни експресії VEGFR-1 та VEGFR-2 на моделях гострого та хронічного ЗЗК.

Матеріали і методи дослідження

Дослідження проведені на щурах самках лінії Sprague-Dawley вагою 160-200 г. Виразковий коліт викликали одноразовим ректальним введенням 0,1 мл 6%-го розчину йодоацетаміду (Sigma, США), розчиненим в 1%-ному розчині метилцелюлози (Sigma, США) (7 см від анального отвору, використовуючи гумовий катетер S8 (Rusch, Німеччина)). Тваринам контрольної групи вводили 0,1 мл 1%-го розчину метилцелюлози. Щурів уметрвляли через 0,5, 1, 2, 6 год. та 1, 3, 7, 14 діб після введення йодоацетаміду, видаляли ділянку товстої кишки 7 см від анального отвору та відразу занурювали в рідкий азот.

Дефіцит цитокіну ІЛ-10 (ІЛ-10^{-/-}) викликає спонтанний розвиток хронічних ЗЗК у мишей, які за клінічними та морфологічними ознаками відповідають таким у людей хворих на дану патологію. Ми використовували ІЛ-10^{-/-} мишей (B6.129P2- $110^{mlCm}/J$), виведених на основі лінії C57BL6. У переважній більшості цих мишей спонтанно виникають запальні ураження в ділянках сліпої та ободової кишки в віці 8-10 тижнів, які часто супроводжуються пролапсом анального сфінктера. Контролем слугували інтактні миші лінії C57BL6. Мишей уметрвляли в віці 12 та 18 тижнів, видаляли товсту кишку від анального отвору до сліпої кишки та відразу занурювали в рідкий азот.

Ізольовану ділянку товстої кишки гомогенізували в лізуючому буфері з додаванням інгібітора протеїназ (Sigma, США). Концентрацію загального білку вимірювали за методом Бредфорда з використанням набору "Bio-Rad для білкового аналізу" (Bio-Rad, США). Розділення та визначення білку (150 мкг заг.білку/зразок) методом Вестерн блот проводили в 7% SDS поліакриламідному гелі з наступним переносом на Hybond-ECL нітроцелюлозну мембрану (Amersham Biosciences, США) згідно стандартного протоколу фірми Bio-Rad. Моноклональне анти-

тіло до VEGFR-1 (1:200; Santa-Cruz Biotech., США) та VEGFR-2 (1:200; Santa-Cruz Biotech., США) використовували для визначення рівня відповідних білків в стінці товстої кишки, з наступною інкубацією із вторинним HRP-кон'югованим антитілом (1:3000, Santa-Cruz Biotech., США). Візуалізацію Вестерн блот проводили ECL-реагентом (Amersham Biosciences, США). Результати не менше трьох різних експериментів піддавали аналізу за допомогою програми PhoretixID.

Статистичну обробку результатів проводили за t тестом Ст'юдента. Дані представлені у вигляді $M \pm \sigma$, n - кількість тварин в групі. Статистично значущою для всіх показників вважали різницю $p < 0,05$.

Отримані результати та їх обговорення

Для дослідження динаміки та характеру змін експресії VEGFR-1 та VEGFR-2 на різних стадіях експериментального ЗЗК ми використовували дві експериментальні моделі: гострий коліт, викликаний 6%-им розчином йодоацетаміду та спонтанно-виникаюче хронічне ЗЗК у ІЛ-10^{-/-} мишей.

Модель йодоацетамід-викликаного виразкового коліту повністю відображає стадійність розвитку гострого запалення в слизовій оболонці товстої кишки [12], а саме: через 1-2 години після введення йодоацетаміду спостерігається збільшення проникності кровоносних судин, масивний набряк слизової оболонки (фаза альтерації), через 6 год. настає фаза ексудації, яка починаючи з 3-7-го днів поступово змінюється проліферацією сполучнотканинних клітин та формуванням грануляційної тканини з вираженим неоангіогенезом і самозагоєнням на 21-й день. В наших дослідженнях розвиток йодоацетамід-викликаного виразкового коліту був асоційований з різнонаправленими змінами експресії VEGFR-1 та VEGFR-2 (Рис.1). Так, введення йодоацетаміду призводило до швидкого зменшення експресії VEGFR-1 протеїну вже через 0,5 год. ($p=0,02$). Поступовий розвиток запалення зі збільшенням інфільтрації лейкоцитів в стінку кишки (24 год.-7 днів) [12] був асоційований з статистично вірогідним збільшенням експресії VEGFR-1. Так, через 24 год. після введення йодоацетаміду, цей показник був в 2 рази вищий за такий у контрольній групі щурів ($p=0,004$) і

залишався на тому ж рівні на 3-й ($p=0,05$) та 7-й дні ($p=0,0005$). Введення йодоацетаміду, навпаки, призводило до поступового збільшення експресії VEGFR-2 протеїну в перші дві години ($p=0,05$), що співпадало у часі зі збільшенням проникності кровососних судин та набряком [2]. Через 6-ть год. спостерігалось різке зниження експресії VEGFR-2, що було асоційоване з загостренням симптомів хвороби, формуванням виразок стінки кишки і ознаками некротичних змін. Важливо зауважити, що на 7-й день, коли вже формується грануляційна тканина та активується процес неоангіогенезу [12], спостерігалась друга хвиля експресії VEGFR-2 протеїну ($p=0,04$).

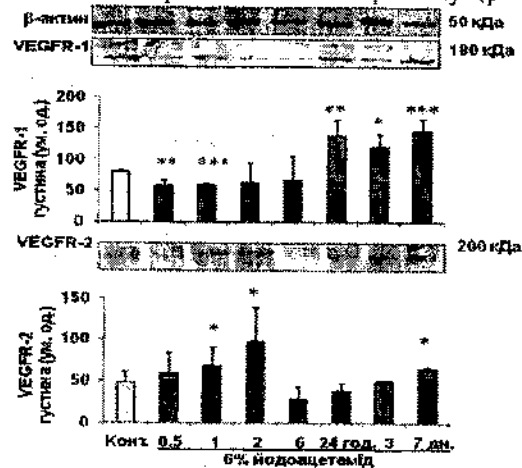


Рис. 1. Експресія VEGFR-1 та VEGFR-2 в слизовій оболонці товстої кишки шурів в різний термін йодоацетамід-викликаного виразкового коліту. Вестерн блот, $n=3$; $M \pm \sigma$. *- $p < 0,05$; **- $p < 0,01$; ***- $p < 0,001$, відносно контрольної (Конт.) групи шурів.

Видалення гену, що відповідає за синтез ІЛ-10 призводить до розвитку хронічного ЗЗК. Danese та ін. [5] продемонстрували збільшення кількості кровососних судин слизової оболонки товстої кишки у ІЛ-10^{-/-} мишей в порівнянні з інтактним контролем, що свідчить про роль ангіогенезу в хронізації запалення при ЗЗК. В наших дослідженнях експресія VEGFR-1 та VEGFR-2 була значно збільшена в слизовій оболонці товстої кишки ІЛ-10^{-/-} мишей в порівнянні з інтактними мишами (Рис.2).

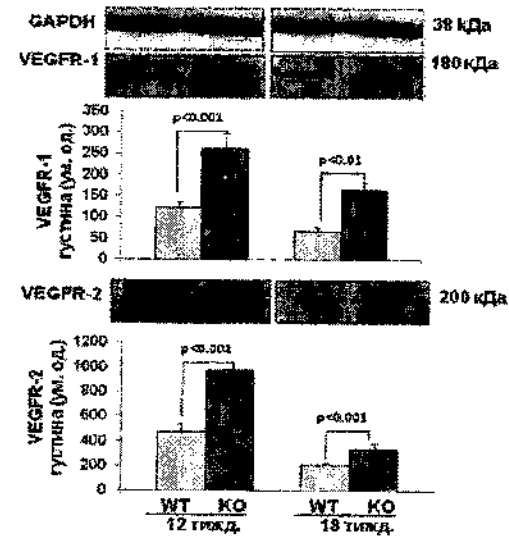


Рис. 2. Експресія VEGFR-1 та VEGFR-2 в слизовій оболонці товстої кишки інтактних мишей (WT) та з спонтанно-виникаючим хронічним ЗЗК у мишей з дефіцитом ІЛ-10 (KO). Вестерн блот. $n=3$; $M \pm \sigma$.

За даними літератури, VEGFR-1 та VEGFR-2 опосередковують різні ефекти VEGF. Так, VEGFR-2 локалізований на ендотеліальних клітинах є основним рецептором, що опосередковує ендотелій-асоційовану дію VEGF: збільшення проліферації та міграції ендотеліальних клітин, стимуляція проникності ендотеліального шару кровососних судин [16]. VEGFR-1, що локалізується на ендотеліальних клітинах має в 10-разів більшу спорідненість до VEGF-A, але в 10-разів меншу тирозинкіназну активність в порівнянні з VEGFR-2. Вважають, що VEGFR-1 - є негативним регулятором активності VEGFR-2, створюючи "пастку" для молекул VEGF-A з наступним формуванням функціонально неактивного комплексу [16]. З іншого боку, VEGFR-1 моноцитів/макрофагів бере участь в процесах хронічного запалення [10, 15]. Його експресія значно збільшується в активованих макрофагах і він опосередковує ефекти VEGF-A на міграцію цих клітин [10].

Спираючись на дані літератури, щодо ролі VEGFR-1 та VEGFR-2 можна припустити, що збільшення експресії VEGFR-

2 на ранніх стадіях розвитку експериментального коліту пов'язано з його роллю в збільшенні проникності кровоносних судин, що супроводжує розвиток гострого запалення. Підвищення експресії цих рецепторів на 7-му добу розвитку йодоацетамід-викликаного коліту, а також при хронічному коліті у ІЛ-10^{-/-} мишей обумовлено його роллю в процесах неангіогенезу, які тісно взаємопов'язані з хронізацією процесів запалення [13]. Поступове збільшення експресії VEGFR-1 в асоціації з загостренням симптомів хвороби (йодоацетамід-викликаний коліт), а також при хронічному протіканні ЗЗК у ІЛ-10^{-/-} мишей, може бути результатом активації моноцитів в стінці товстої кишки, а також збільшення їх інфільтрації. Також, не можна виключати ролі VEGFR-1, як негативного регулятора активності VEGFR-2 і збільшення його експресії, як захисної реакції організму на надлишкову експресію VEGFR-2.

Висновки

1. Ми вперше провели порівняльний аналіз динаміки експресії VEGFR-1 та VEGFR-2 за умов гострого та хронічного експериментального ЗЗК.

2. Отримані нами дані можуть стати підґрунтям для подальшого дослідження ролі цих рецепторів та опосередкованих ними ефектів в патогенезі ЗЗК.

Література

1. Белоусова Е.А. Язвенный колит и болезнь Крона / Белоусова Е.А. - М.: Триада, 2002 - 127с.

2. Роль Src тирозинкіназ в підвищенні проникності кровоносних судин при експериментальному виразковому коліті / Г. Толстанова, Т. Хоменко, Л. Остапченко [та ін.] // Український біохімічний журнал. - 2010. - Т. 82, № 1. - С. 46-51.

3. Толстанова Г.М. Зміни експресії васкулярного ендотеліального фактору росту (VEGF) та VEGFR-2 рецептора при експериментальних запальних захворюваннях

кишечника / Г.М. Толстанова, Т.В. Берегова, Л.І. Остапченко // Фізика живого. - 2009. - Т. 17, № 1. - С. 150-154.

4. Senger D.R. A highly conserved vascular permeability factor secreted by a variety of human and rodent tumor cell lines / D.R. Senger, C.A. Perruzzi, J. Feder // *Cancer Res.* - 1986. - Vol. 46. - P. 5629-5632.

5. Angiogenesis blockade as a new therapeutic approach to experimental colitis / S. Danese, M. Sans, D.M. Spencer [et al] // *Gut.* - 2007. - Vol. 56, № 6. - P. 855-862.

6. Ferrara N. The biology of VEGF and its receptors / N. Ferrara, H.P. Gerber, J. LeCouter // *Nat. Med.* - 2003. - Vol. 9. - P. 669-676.

7. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene / N. Ferrara, K. Carver-Moore, H. Chen [et al] // *Nature.* - 1996. - Vol. 380. - P. 439-442.

8. Griga T. Increased production of vascular endothelial growth factor by intestinal mucosa of patients with inflammatory bowel disease / T. Griga, E. Voigt, B. Gretzer [et al] // *Hepatology.* - 1999. - Vol. 46, № 26. - P. 920-923.

9. Kowanetz M. Vascular endothelial growth factor signaling pathways: therapeutic perspective / M. Kowanetz, N. Ferrara // *Clin. Cancer Res.* - 2006. - Vol. 12, № 17. - P. 5018-5022.

10. Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1 / B. Barleon, S. Sozzani, D. Zhou [et al] // *Blood.* - 1996. - Vol. 87, № 8. - P. 3336-3343.

11. Neutralizing anti-VEGF antibody reduces severity of experimental ulcerative colitis in rats. Direct evidence for the pathogenic role of VEGF / G. Tolstanova, T. Khomenko, X. Deng [et al] // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* - 2009. - Vol. 328, № 3. - P. 749-757.

12. New ulcerative colitis model induced by SH blockers in rats and the effects of antiinflammatory drugs on the colitis

/ H. Satoh, F. Sato, K. Takami [et al] // *Jpn. J. Pharmacol.* - 1997. - Vol. 73, № 3. - P. 299-309.

13. Pathogenic angiogenesis in IBD and experimental colitis: new ideas and therapeutic avenues / J.H. Jr. Chidlow, D. Shukla, M.B. Grisham [et al] // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.* - 2007. - Vol. 293. - G. 5-18.

14. Proinflammatory functions of vascular endothelial growth factor in alloimmunity / M.E.J. Reinders, M. Sho, A. Izawa [et al] // *J.Clin.Invest.* - 2003. - Vol. 112. - P.1655-1665.

15. Revascularization of ischemic tissues by PlGF treatment, and inhibition of tumor angiogenesis, arthritis and atherosclerosis by anti-Flt1 / A. Luttmann, M. Tjwa, L. Moons [et al] // *Nat. Med.* - 2002. - Vol. 8, № 8. - P. 831-840.

16. Shibuya M. Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis / M. Shibuya, L. Claesson-Welsh // *Exp. Cell.Res.* - 2006. - Vol. 312, № 5. - P. 549-60.

Резюме

Толстанова Г.М. Експресія рецепторів до фактору росту кровосносних судин VEGFR-1 та VEGFR-2 при експериментальних запальних захворюваннях кишечника.

Метою роботи було порівняти зміни експресії VEGFR-1 та VEGFR-2 на моделях гострого та хронічного запального захворювання кишечника (ЗЗК). Використано дві експериментальні моделі: гострий коліт, викликаний 6%-им розчином йодоацетаміду у щурів та спонтанно-виникаюче хронічне ЗЗК у IL-10^{-/-} мишей. Розвиток йодоацетамід-викликаного виразкового коліту був асоційований з різнонаправленими змінами експресії протеїнів VEGFR-1 та VEGFR-2. У IL-10^{-/-} мишей, в віці 12 та 18 тижнів, експресія цих рецепторів була значно збільшена в порівнянні з інтактними мишами.

Ключові слова: запальні захворювання кишечника, виразковий коліт, VEGFR-1, VEGFR-2, щури, миші.

Резюме

Толстанова А.М. Експресія рецепторів до фактору росту кровосносних судин VEGFR-1 та VEGFR-2 при експериментальних запальних захворюваннях кишечника.

Целью работы было сравнить изменения экспрессии VEGFR-1 и VEGFR-2 на моделях острого и хронического воспалительного заболевания кишечника (ВЗК). Использовано две экспериментальные модели: острый колит, вызванный 6%-ым раствором йодоацетамидом у крыс и спонтанно-возникающее ВЗК у IL-10^{-/-} мышей. Развитие йодоацетамид-вызванного язвенного колита ассоциировалось с разнонаправленными изменениями экспрессии протеинов VEGFR-1 и VEGFR-2 в слизистой оболочке толстой кишки крыс. У IL-10^{-/-} мышей, в возрасте 12 и 18 недель, экспрессия этих рецепторов была значительно увеличена по сравнению с интактными животными.

Ключові слова: воспалительные заболевания кишечника, язвенный колит, VEGFR-1, VEGFR-2, крысы, мыши.

Summary

Toistanova G.M. Expression of vascular endothelial growth factor receptors VEGFR-1 and VEGFR-2 during experimental inflammatory bowel disease.

The aim of the present study to compare expression of VEGFR-1 and VEGFR-2 on the acute and chronic inflammatory bowel disease (IBD) models. Acute colitis in rats by intracolonic administration of 6% iodoacetamide and spontaneously-developed IBD in IL-10^{-/-} mice were used. Development of iodoacetamide-induced colitis was associated with different expression of VEGFR-1 and VEGFR-2 proteins in rat colonic mucosa. IL-10^{-/-} mice of 12 and 18 weeks age had significantly increased expression of both receptors.

Ключові слова: inflammatory bowel disease, ulcerative colitis, VEGFR-1, VEGFR-2, rats, mice.

Рецензент: д.біол.н., проф.С.М.Федченко