

УДК 616.341-008.9:615.276

ПРОТЕОМНЫЙ ПРОФИЛЬ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ТОНКОЙ КИШКИ ПРИ НПВП-ИНДУЦИРОВАННОЙ ЭНТЕРОПАТИИ**¹Агамаян Е.О., ¹Тарасова Г.Н., ²Сарвилина И.В.**¹ГБОУ ВПО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России, Ростов-на-Дону, e-mail: doctorgastro@yandex.ru;²ООО Медицинский центр «Новомедицина»

Изучен протеомный спектр слизистой оболочки тонкой кишки при НПВП-индуцированной энтеропатии. Протеомный анализ проводили с помощью предварительного фракционирования на магнитных микрочастицах и последующей тандемной времяпролетной MALDI-масс-спектрометрии с использованием биоинформационных алгоритмов. Идентифицированы 34 белка, для которых установлено изменение продукции (для 16 белков – повышение и для 18 – снижение) при указанном заболевании. Среди них можно выделить белки, участвующие в регуляции воспаления, апоптоза, адгезии, транспорта ионов и других процессов. Выявленные различия в протеомном профиле слизистой тонкой кишки, очевидно, имеют патогенетическое значение в формировании и развитии НПВП-индуцированной энтеропатии. Обсуждается возможное значение дифференциально-экспрессирующихся белков в развитии основных нарушений этой патологии. Обнаруженные белки отличия могут служить маркерами НПВП-индуцированной энтеропатии.

Ключевые слова: протеомный анализ, слизистая оболочка, тонкая кишка, НПВП – индуцированная энтеропатия

PROTEOMIC PROFILE OF THE MUCOSA OF THE SMALL INTESTINE IN NSAID-INDUCED ENTEROPATHY**¹Atamanyan E.O., ¹Tarasova G.N., ²Sarvilina I.V.**¹Rostov State Medical University, Rostov, e-mail: doctorgastro@yandex.ru;²ООО Medical center «Navomedicine»

Proteomic spectrum of small intestine's mucosa with NSAID-induced enteropathy was studied. Proteomic analysis was performed using prefraction on magnetic microparticles and subsequent tandem time-of-flight MALDI-mass-spectrometry by applying bioinformational algorithms. For 34 identified proteins the change of production (16 proteins – increase, 18 – decrease) has been determined for the indicated disease. Among them there are proteins involved in the regulation of inflammation, apoptosis, adhesion, ion transport and other processes. Educed differences of the small intestine's mucosa proteomic profile are, obviously, significant for the NSAID-induced enteropathy formation and development. The possible importance of the differential-expression proteins in the development of the major disturbances of this pathology is discussing. Detected proteins of difference can serve as markers of NSAID-induced enteropathy.

Keywords: proteomic analysis, mucosa, small intestine, NSAID – induced enteropathy

В мировой медицинской литературе представлено огромное количество данных, описывающих побочные эффекты терапии нестероидными противовоспалительными препаратами (НПВП). Хотя токсический потенциал НПВП может быть реализован практически в любом органе и системе, основные побочные эффекты данной группы лекарственных средств закономерно связаны с влиянием на желудочно-кишечный тракт [3]. В тонкой кишке происходит всасывание большей части НПВП при пероральном приеме, что создает условия для локального повреждающего воздействия препаратов и развития НПВП-индуцированной энтеропатии [4].

В настоящее время не вызывает сомнений, что большинство патологических изменений в функционировании клеток, тканей или органов сопровождается отклонением в экспрессии белков – участни-

ков конечной стадии передачи информации в клетке [1]. На современном этапе развития молекулярной биологии и медицины наиболее полную информацию о белковом составе исследуемых объектов (протеоме) может дать протеомный анализ. Данный подход подразумевает комплексное изучение протеома методами и технологиями, направленными на одновременное разделение, а также последующую идентификацию и анализ тысячи белков, синтезирующихся в клетке [2]. Использование протеомного анализа в гастроэнтерологии позволяет выяснить ранее неизвестные молекулярные механизмы формирования и развития НПВП-индуцированной энтеропатии, что будет способствовать созданию принципиально новых методов ее прогнозирования и диагностики.

В связи с вышеизложенным целью работы явилось изучение протеомного

профиля слизистой оболочки тонкой кишки при НПВП-индуцированной энтеропатии.

Материалы и методы исследования

В течение 2 лет в исследование было включено 20 пациентов с остеоартрозом, принимавших диклофенак в дозе 100 мг/сут в сутки, и верифицированной НПВП-энтеропатией, в возрасте от 25 до 38 лет – 12 (60%) женщин и 8 (40%) мужчин. Продолжительность заболевания варьировала от 1 года до 8 лет. Критериями включения в исследование являлись типичные симптомы (боль, чувство «жжения» и тяжести в эпигастральной области), железодефицитная анемия и гипоальбуминемия. Критериями исключения из исследования являлись онкологические заболевания желудочно-кишечного тракта, язвенно-эрозивные повреждения двенадцатиперстной кишки, хирургические операции по поводу заболеваний тонкой кишки в анамнезе, прием антисекреторных и прокинетиических лекарственных средств в течение месяца и 15 дней перед включением в исследование. Контрольная группа – 20 практически здоровых лиц. Возраст обследованных колебался в пределах от 37 до 70 лет. Средний возраст пациентов в основной группе – $52,97 \pm 2,64$ года, в контрольной группе – $36,2 \pm 10,2$ года. НПВП-энтеропатия верифицирована эндоскопически и морфологически. Материал для общеморфологического и протеомного анализа получали при эндоскопическом исследовании из дистальных отделов двенадцатиперстной кишки.

Для предварительного фракционирования образцов слизистой тонкой кишки использовали стандартные наборы для профилирования, содержащие магнитные микрочастицы с различными поверхностями MB-NiC C8, MB-IMAC Cu, MB-WCX, согласно методике производителя (Bruker Daltonics, Германия). Подготовка к проведению масс-спектрометрического анализа состояла в следующем: элюаты наносили на стальную мишень AnchorChip™, после высушивания на воздухе образец покрывали раствором матрицы. В качестве матрицы использовали смесь 2,5-дигидроксибензойной и α -цианогидроксикоричной кислот в смеси метанол/ацетонитрил/вода (5:4:1). Масс-спектры получали с использованием tandemного MALDI-TOF/TOF (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry)-масс-спектрометра Ultraflex II (Bruker Daltonics, Германия). Спектры калибровали с помощью внешних стандартов, представляющих смесь белков и пептидов с известными массами (Bruker Daltonics, Германия). Каждый масс-спектр был проанализирован с помощью программ FlexAnalysis 3.0 и ClinProTools 2.1 (Bruker Daltonics, Германия). Идентификацию белков и пептидов проводили путем поиска соответствующих кандидатов в базах данных NCBI и SwissProt/UniProt с использованием программы Mascot Search (v 2.1, Matrix Science, Великобритания). Результаты идентификации белков принимались как достоверные при уровне значимости не менее 95% и показателе сиквенс-покрытия не менее 60%.

Достоверность различий между протеомными спектрами слизистой оболочки тонкой кишки пациентов контрольной и основной групп определяли с помощью непараметрического χ^2 -критерия (программа Statistica версия 6.0.). Достоверными считались различия при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Сопоставление протеомного профиля слизистой тонкой кишки пациентов контрольной и основной групп позволило выявить ряд белков отличия, присутствие или отсутствие которых имеет место только при НПВП-индуцированной энтеропатии (таблица). Так, в слизистой оболочке тонкой кишки пациентов основной группы установлено появление 16 белков: субъединицы p-65 фактора NF- κ B, кальгранулина, фактора некроза опухоли- α (ФНО- α), трансформирующего фактора роста- β (ТФР- β), интерлейкина (ИЛ)-1 β , ИЛ-2, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-12A, Smad3, PPAR- γ , CFTR, нейропилина 1, β -дефензина-1, HspA8, Hsp27, не обнаруженных у пациентов контрольной группы.

Среди них следует особо выделить транскрипционный фактор NF- κ B (субъединица p-65), который контролирует экспрессию ряда генов, участвующих в иммунных и воспалительных реакциях, клеточной адгезии, апоптозе, дифференцировке и пролиферации. Известно, что активация транскрипционного ядерного фактора NF- κ B является ключевым моментом в индукции синтеза провоспалительных медиаторов, таких как ИЛ-1 β , ИЛ-2, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-12A и ФНО- α [7]. Сопряженное с возрастанием уровня NF- κ B увеличение экспрессии вышеуказанных цитокинов, установленное нами при НПВП-индуцированной энтеропатии, способствует развитию воспалительных процессов в слизистой тонкой кишки. Активации и перемещению в ядро клетки фактора NF- κ B способствует кальгранулин A [8], продукция которого также повышена в интерстициальной слизистой у пациентов основной группы.

Увеличение продукции иммунорегуляторного цитокина ТФР- β приводит к усилению экспрессии его цитоплазматического медиатора SMAD3 и нейропилина 1 – трансмембранного ко-рецептора, что способствует формированию подслизистого фиброза в стенке тонкой кишки при НПВП-индуцированной энтеропатии за счет индукции синтеза коллагена [6].

Еще один белок с повышенным уровнем CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) – цАМФ-активируемый Cl⁻ канал, локализующийся на мембране эритроцитов [9]. Увеличение продукции белка CFTR при изучаемой патологии приводит к усилению секреции воды в просвет тонкой кишки вследствие повышения секреции Cl⁻ и развитию диарейного синдрома, являющегося одним из побочных эффектов НПВП.

Белки отличия, идентифицированные в слизистой оболочке тонкой кишки
пациентов контрольной и основной групп

№ п/п	Название белка	Мм, Да	Номер в базе UniProt	Контр. группа	Основн. группа	p
1	Nuclear factor NF-kappa-B p65 subunit	105356	Q04206	↓	↑	0,001
2	Calgranulin-A	13242	P05109	↓	↑	0,003
3	Heat shock 27 kDa protein (Hsp27)	27000	P04792	↓	↑	0,000
4	Tumor necrosis factor-alfa	25644	P01375	↓	↑	0,035
5	Smad3 (mothers against decapentaplegic homolog 3)	48081	P84022	↓	↑	0,000
6	Transforming growth factor beta 1	44341	P01137	↓	↑	0,08
7	Heat shock 70 kDa protein 8 (HspA8)	70052	P11142	↓	↑	0,035
8	Peroxisome proliferator-activated receptors-gamma protein (PPAR-γ)	57620	P37231	↓	↑	0,047
9	Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)	168142	P13569	↓	↑	0,000
10	Interleukin-1beta	30748	P01584	↓	↑	0,001
11	Interleukin-2	17628	P60568	↓	↑	0,003
12	Interleukin-6	23718	P05231	↓	↑	0,045
13	Interleukin-8	11098	P10145	↓	↑	0,008
14	Interleukin-12A	24874	P29459	↓	↑	0,008
15	Neuropilin-1	103134	O14786	↓	↑	0,045
16	Beta-defensin 1	7400	P60022	↓	↑	0,001
17	Carbonic anhydrase I	28870	P00915	↑	↓	0,000
18	Carbonic anhydrase II	29246	P00918	↑	↓	0,000
19	Carbonic anhydrase IV	35032	P22748	↑	↓	0,008
20	Fatty-acid binding protein, intestinal	14208	P12104	↑	↓	0,000
21	Fibronectin	25159	P02751	↑	↓	0,000
22	Laminin subunit gamma-1	204559	P11047	↑	↓	0,000
23	Chromogranin A	50688	P10645	↑	↓	0,000
24	Peptide YY	84505	P10082	↑	↓	0,000
25	Prostaglandin dehydrogenase 1	28977	P15428	↑	↓	0,001
26	Collagen alpha-4(IV) chain	164038	P53420	↑	↓	0,000
27	Glycoprotein A33	35632	Q99795	↑	↓	0,008
28	Somatostatin	12736	P61278	↑	↓	0,000
29	Thiosulfate sulfurtransferase	58263	Q16762	↑	↓	0,000
30	11-beta-hydroxysteroid dehydrogenase 1	34288	P28845	↑	↓	0,000
31	Vasoactive intestinal polypeptide receptor 1	51547	P32241	↑	↓	0,000
32	Glutathione peroxidases 2	21954	P18283	↑	↓	0,000
33	Sulfate transporter (SLC26A2)	81662	P50443	↑	↓	0,001
34	Chloride anion exchanger (SLC26A3)	84505	P40879	↑	↓	0,001

Примечание. Мм – молекулярная масса, p – достоверность отличий между группами, «↑» – повышение экспрессии белка, «↓» – снижение экспрессии белка.

Компенсаторное значение при данной патологии, очевидно, имеет усиление экспрессии шаперонов HspA8 и Hsp27, которые играют важную роль в защите целостности слизистой оболочки кишечника, уменьшая индукцию апоптоза, вызванную НПВП. Таким же компенсаторным механизмом, очевидно, является увеличение синтеза в слизистой тонкой кишки при НПВП-индуцированной энтеропатии антимикробного пептида β-дефензина-1.

С помощью масс-спектрометрического анализа были идентифицированы 18 бел-

ков, экспрессия которых резко снижена или полностью отсутствует в слизистой тонкой кишки при НПВП-индуцированной энтеропатии. К этим белкам относятся интестинальный белок, связывающий жирные кислоты, хлорид-анионный транспортер, белок-переносчик сульфат-ионов, трансмембранный гликопротеин A33, рецептор 1 к вазоактивному интерстициальному пептиду, хромогранин А, пептид YY, соматостатин, глутатионпероксидаза 2, тиосульфат-сульфотрансфераза, простагландин

дегидрогеназа 1, 11-β-гидроксистероид дегидрогеназа 1, коллаген IV типа, фибронектин, ламинина (гамма 1 субъединица), карбоангидразы I, II и IV.

Принимая во внимание многочисленные функции соматостатина, пептида YY и хромогранина в ЖКТ (регуляция перистальтики, воспалительных реакций, секреции гормонов и ионов), можно полагать, что снижение продукции этих белков, очевидно, связанное с редукцией числа энтероэндокринных клеток в слизистой кишечника, приводит к расстройствам пищеварения у пациентов, принимающих НПВП.

Уменьшение синтеза карбоангидразы (I, II и IV) создает условия для повреждения слизистого барьера из-за недостаточной продукции этим ферментом бикарбонатов – основных анионов, обеспечивающих защиту эпителия, и может быть причиной эрозивно-язвенных поражений тонкой кишки на фоне длительного приема НПВП.

Установленное снижение экспрессии хлорид-анионного транспортера (SLC26A3) в слизистой тонкой кишки при НПВП-энтеропатии приводит к нарушению поступления ионов хлора в энтероциты и, таким образом, увеличению объема жидкости в просвете кишечника, обуславливая развитие диареи [5].

Что касается глутатионпероксидазы 2, которая защищает клетки от действия активных форм кислорода и апоптоза, то сокращение продукции этого фермента способствует развитию дезорганизационных изменений в эпителии слизистой и снижению его барьерной функции.

Подавление экспрессии при НПВП-индуцированной энтеропатии трансмембранного гликопротеина A33 и белков внеклеточного матрикса – ламинина, коллагена IV типа и фибронектина, играющих важную роль в адгезии энтероцитов, приводит к нарушению межклеточных взаимодействий и, как следствие, увеличению проницаемости кишечного барьера, создавая условия для транслокации бактериальной флоры в кишечную стенку с развитием хронического воспаления.

Заключение

Резюмируя полученные данные, можно заключить, что модификация экспрессии белков, участвующих в регуляции воспаления, апоптоза, адгезии, транспорта ионов и других важных биологических процессов, является патогенетическим фактором развития НПВП-индуцированной энтеропатии. Полученные нами с помощью протеомного анализа данные позволяют расширить наши представления о молекулярных механизмах развития маркеров данной патологии. Выявленные белки слизистой оболочки кишечника могут быть использованы в качестве информативных маркеров НПВП-индуцированной энтеропатии.

Список литературы

1. Говорун В.М., Арчаков А.И. Протеомные технологии в современной биомедицинской науке // Биохимия. – 2002. – № 10. – С. 1341–1359.
2. Громов П.С., Целис Х.Э. От геномики к протеомике // Молекулярная биология. – 2000. – № 4. – С. 597–611.
3. Евсеев М.А. Повреждение кишечной трубки нестероидными противовоспалительными препаратами: клиническое значение, патогенез, возможности профилактики // Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика. – 2013. – № 1. – С. 79–87.
4. Каратаев А.Е., Насонова В.А. Энтеропатия, индуцированная нестероидными противовоспалительными препаратами // Терапевтический архив. – 2004. – № 2. – С. 79–82.
5. Alper S.L., Sharma A.K. The SLC26 gene family of anion transporters and channels // Mol. Aspects Med. – 2013. – Vol. 34, № 2–3. – P. 494–515.
6. Cao Y., Szabolcs A., Dutta S.K. et al. Neuropilin-1 mediates divergent R-Smad signaling and the myofibroblast phenotype // J. Biol. Chem. – 2010. – Vol. 285, № 41. – P. 31840–31848.
7. Shishodia S., Aggarwal B.B. Nuclear factor-kappaB activation: a question of life or death // J. Biochem. Mol. Biol. – 2002. – Vol. 35, № 1. – P. 28–40.
8. Sunahori K., Yamamura M., Yamana J. et al. The S100A8/A9 heterodimer amplifies proinflammatory cytokine production by macrophages via activation of nuclear factor kappa B and p38 mitogen-activated protein kinase in rheumatoid arthritis // Arthritis Res. Ther. – 2006. – Vol. 8, № 3. – R69.
9. Thiagarajah J.R., Verkman A.S. CFTR pharmacology and its role in intestinal fluid secretion // Curr. Opin. Pharmacol. – 2003. – Vol. 3, № 6. – P. 594–599.

References

1. Govorun V.M., Archakov A.I. Proteomnye tehnologii v sovremennoj biomedicinskoj nauke. Biohimija, 2002, no. 10, pp. 1341–1359.
2. Gromov P.S., Celis H.Je. Ot genomiki k proteomike. Molekuljarnaja biologija, 2000, no. 4, pp. 597–611.
3. Evseev M.A. Povrezhdenie kishhečnoj trubki nesteroidnymi protivovospalitel'nymi preparatami: klinicheskoe znachenie, patogenez, vozmozhnosti profilaktiki, Nevrologija, nejropsihiatrija, psihosomatika, 2013, no. 1, pp. 79–87.
4. Karataev A.E., Nasonova V.A. Jenteropatija, inducirovannaja nesteroidnymi protivovospalitel'nymi preparatami, Terapevticheskij arhiv, 2004, no. 2, pp. 79–82.
5. Alper S.L., Sharma A.K. The SLC26 gene family of anion transporters and channels // Mol. Aspects Med. 2013. Vol. 34, no. 2–3. pp. 494–515.
6. Cao Y., Szabolcs A., Dutta S.K. et al. Neuropilin-1 mediates divergent R-Smad signaling and the myofibroblast phenotype // J. Biol. Chem. 2010. Vol. 285, no. 41. P. 31840–31848.
7. Shishodia S., Aggarwal B.B. Nuclear factor-kappaB activation: a question of life or death // J. Biochem. Mol. Biol. 2002. Vol. 35, no. 1. pp. 28–40.
8. Sunahori K., Yamamura M., Yamana J. et al. The S100A8/A9 heterodimer amplifies proinflammatory cytokine production by macrophages via activation of nuclear factor kappa B and p38 mitogen-activated protein kinase in rheumatoid arthritis // Arthritis Res. Ther. 2006. Vol. 8, no. 3. pp. 69.
9. Thiagarajah J.R., Verkman A.S. CFTR pharmacology and its role in intestinal fluid secretion // Curr. Opin. Pharmacol. 2003. Vol. 3, no. 6. pp. 594–599.

Рецензенты:

Погорелова Т.Н., д.б.н., профессор, заведующая отделом медико-биологических проблем, ФГБУ РНИИАП Минздрава России, г. Ростов-на-Дону;

Яковлев А.А., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой гастроэнтерологии и эндоскопии с курсом клинической фармакологии ФПК и ППС, ГБОУ ВПО «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Ростов-на-Дону.