World Journal of Gastroenterology

Online Submissions: http://www.wjgnet.com/esps/
wjg@wjgnet.com
doi:10.3748/wjg.v19.i25.3980

World J Gastroenterol 2013 July 7; 19(25): 3980-3989
ISSN 1007-9327 (print) ISSN 2219-2840 (online)
© 2013 Baishideng. All rights reserved.

ORIGINAL ARTICLE

Полидатин ослабляет пищевую аллергию, ингибируя в мастоцитах активность клеточных канальцев, регулирующих запасы кальция

Bo Yang, Jian-Jie Li, Ji-Juan Cao, Cheng-Bin Yang, Jie Liu, Qiong-Mei Ji, Zhi-Gang Liu

АННОТАЦИЯ

ЦЕЛЬ: Исследование действия полидатина (PD), глюкозида ресвератрола, на дегрануляцию мастоцитов и противоаллергическую активность.

МЕТОДЫ: После того, как крысам в течение 48 дней повышали чувствительность пищеварительного тракта путем приема в рот овальбумина (OVA), а затем в течение 4 дней проводилось лечение полидатином (PD), всех крыс стимулировали овальбумином (OVA) в дозе 100 мг/мл, и через 24 часа после этого умерщвляли для проведения дальнейших экспериментов.

Тонкий кишечник во всех группах подготавливался для морфологического обследования путем окрашивания гематоксилином и эозином. Мы также использовали инкубатор органов для оценки сократительной способности тонкого кишечника. Специфичные для OVA выработка иммуноглобулина E (IgE) и уровни экспрессии интерлейкина-4 (IL-4) в сыворотке крови и супернатанте гомогенатов мукозы кишечника анализировались с помощью ферментного иммуносорбентного теста (ELISA). Путем окрашивания красителем толуидин синий анализировались активация и дегрануляция изолированных у крыс брюшинных мастоцитов (RPMC). Выделение гистамина из клеток RPMC измерялось методом ELISA, а влияние PD на внутриклеточную мобилизацию Ca^{2+} исследовалось определением внутриклеточного содержания Ca2+ путем применения флуоресцентного красителя fluo-4; соответствующие сигналы записывались и подлежали анализу.

РЕЗУЛЬТАТЫ: Мы обнаружили, что внутрижелудочное лечение полидатином (PD) существенно снижало потерю целостности мукозного барьера в тонком кишечнике. Тем не менее, повышение чувствительности с помощью OVA вызывало значительную гиперактивность в тонком кишечнике аллергических крыс, которая ослаблялась приемом PD на 42% (1.26 ± 0.13 г по сравнению с группой OVA: 2.18 ± 0.21 г, P <0.01). PD-терапия также ингибировала выработку IgE (3.95 ± 0.53 нг/мл по сравнению с группой OVA: 4.53 ± 0.52 нг/мл, P < 0.05) путем подавления секреции цитокинов типа Th2, IL-4, на 34% (38.58 ± 4.41 пг/мл по сравнению с группой OVA: 58.15 ± 6.24 пг/мл, P < 0.01). Доля дегранулированных мастоцитов, как показывает число гранул вокруг этих клеток (их, по меньшей мере, пять), резко возросла в группе OVA (в 5.5 раз) (63.50% ± 15.51% по сравнению с группой, получавшей физиологический раствор с фосфатным буфером: 11.15% ± 8.26%, P < 0.001) и упало на 65% после обработки PD (21.95% ± 4.37% по сравнению с OVA 63.50% ± 15.51%, P < 0.001). Обусловленное применением PD ослабление дегрануляции мастоцитов было также подтверждено сокращением уровней гистамина как в сыворотке крови (5.98 ± 0.17 по сравнению с группой OVA: 6.67 ± 0.12, P < 0.05), так и в гомогенатах мукозы кишечника (5.83 ± 0.91 по сравнению с группой OVA: 7.35 ± 0.97, P < 0.05). Более того, мы продемонстрировали, что прием PD существенно снижает дегрануляцию мастоцитов из-за сокращения поступления Ca^{2+} по оегулирующим запас кальция в клетках канальцам (SOC) (2.35 ± 0.39 по сравнению с группой OVA: 3.51 ± 0.38, P < 0.01).

ВЫВОДЫ: В совокупности наши данные указывают на то, что PD стабилизирует мастоциты путем подавления внутриклеточной мобилизации Ca^{2+}, в основном путем ингибирования попадания Ca^{2+} в мастоциты через канальцы SOC, и, таким образом, играет защитную роль в борьбе с усиленной применением OVA пищевой аллергией.

Ключевые слова: Полидатин; Пищевая аллергия; Мастоциты; Канальцы, регулирующие запас кальция в клетках; Ca^{2+}

Важное примечание: В данном исследовании мы впервые продемонстрировали, что полидатин способен предотвращать патогенез пищевой аллергии, и этот эффект зависит от регуляции мобилизации Ca^{2+} через канальцы в мастоцитах, регулирующие запасы кальция.

ВВЕДЕНИЕ

Пищевая аллергия (FA) это негативная реакция организма, опосредованная иммуноглобулином E (IgE) или парными антителами (non-IgE) [1], которая включает в себя аномальный ответ иммунной системы на специфические протеины в пищевых продуктах [2]. FA уже признана проблемой со здоровьем, актуальной во всем мире и особенно в западных странах, что обусловлено тяжестью реакций и резким возрастанием этой проблемы за последние три десятилетия [3-5]. Большинство пищевых аллергий в мире вызвано “восемью основными пищевыми аллергенами”; сюда входят арахис, древесные орехи, яйца, молоко, рыба, ракообразные и раковинные моллюски, пшеница и соя [6]. По оценкам, от FA страдает 25% младенцев [7], 8% детей [3-5], и 2%-5% взрослых [8]. Тем не менее, современное понимание этиологии пищевых аллергий остается неудовлетворительным, и еще не найдено никаких эффективных способов лечения, за исключением соблюдения диеты и принятия превентивных мер, выражающихся в отказе от вызывающих аллергические реакции пищевых продуктов.

Мастоциты играют важную роль в развитии кишечных воспалительных расстройств, возникающих из-за пищевой аллергии. Перекрёстное связывание аллергенами высокоафинных рецепторов IgE (FcεRI), имеющихся на мастоцитах, приводит к дегрануляции, выработке лейкотриена и синтезу цитокинов. Дегранулированные мастоциты выделяют воспалительные медиаторы, включая гистамин и цитокины типа Th2 [9], что вызывает аномальные сокращения кишечника и повреждение кишечной мукозы, а это в свою очередь приводит к брюшным болям, судорогам, рвоте, и/или диарее [10]. Уже известно, что дегрануляция IgE-зависимых мастоцитов опирается на внутриклеточную сигнализацию Ca^{2+} [11,12]. Цитоплазматический Ca^{2+} в основном пополняется за счет Ca^{2+}, хранящегося в эндоплазматической сети (ER), и внеклеточного Ca^{2+} , поступающего по регулирующим запасы кальция в клетке канальцам (SOC) [13]. Поэтому изменение характера мобилизации Ca^{2+} потенциально является терапевтической стратегией по стабилизации мастоцитов при активации рецпторов FcεRI. Эта стратегия потенциально имеет перспективы стать новым методом лечения аллергических заболеваний.

Полидатин (PD), также известный как *polygoni cuspidate radix*, является натуральным компонентом, выделенным из растения из семейства гречишных *Polygonum cuspidatum*. С точки зрения химического состава он был определен как глюкозид ресвератрола со следующей молекулярной структурой: 3,4,5-тригидроксистильбен-3-D-моно-D-глюкозид. Предыдущие исследования продемонстрировали, что PD имеет терапевтическое значение для лечения аллергических заболеваний. Используя на мышах модель пассивного кожного анафилаксиса (PCA), Lim et al[14] показали, что PD снижает дегрануляцию мастоцитов

путем подавления фосфорилирования Syk-киназы и активированных митогеном протеинкиназ. С другой стороны, Yuan et al[15] обнаружили, что PD смягчает модель PCA у мышей за счет стабилизации мастоцитов путем ингибирования активации канальцев, проводящих Ca^{2+} и регулирующих запас кальция в мастоцитах. Тем не менее, терапевтический эффект PD в преодолении пищевых аллергий еще не был определен.

В этом исследовании мы применили модель пищевой аллергии, индуцированной овальбумином (OVA), и оценили терапевтическое действие PD против пищевой аллергии. Кроме того, мы исследовали влияние PD на дегрануляцию мастоцитов и обнаружили, что лежащий в основе его действия механизм связан с изменением мобилизации Ca^{2+}.

Представленное здесь исследование является первым этапом, и задача здесь состоит в демонстрации того, что PD может ингибировать пищевую аллергию путем подавления дегрануляции мастоцитов через регуляцию канальцев SOC.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные

Самки крыс породы Brown-Norway (BN) (серые крысы) в возрасте четырех недель были куплены в лаборатории Vital River Laboratories (Пекин, Китай) и разделены на 4 группы (рассажены в 4 клетки). Они содержались в помещении с контролируемыми параметрами окружающей среды с температурой $20^{O}C \pm 2^{O}C$, где был принят фотопериод, при котором 12 светлых часов чередовались с 12 часами темноты. Санитарный контроль выполнялся в отношении всех основных патогенов грызунов, и результаты этих тестов неизменно были отрицательными. Все экспериментальные процедуры над животными были одобрены «Комитетом контроля ухода за животными и их использования» университета города Shenzhen (Китай), и все эксперименты выполнялись в соответствии с «Руководством по уходу за лабораторными животными и их использованию», опубликованным «Национальным институтом здравоохранения США» (публикация № 85-23, в редакции 1996 г.).

Сорок восемь крыс породы Brown-Norway были случайным образом разделены на четыре группы: контрольная группа (n = 12), группа OVA (n = 12), группа OVA + PD (n = 12) и группа PD (n = 12). Каждая крыса, в зависимости от того, к какой группе она принадлежала, получила или физиологический раствор с фосфатным буфером (PBS), или OVA, или PD, как показано на Рис. 1 [16]. Контрольная группа получала 1 мл раствора PBS (0.1 моль/л) ежедневно в течение 52 дней путем принудительного питания. Группа OVA получала в рот 1 мг OVA (1 мг/мл) в течение первых 48 дней и 1 мл раствора PBS (0.1 моль/л), начиная с 48-ого дня по 52-ой. Каждая крыса в группе OVA + PD получала PD (150 мг/мл × 1 мл ежедневно) в рот, начиная с 49 дня по 52-ой после многодневного повышения чувствительности пищеварительного тракта в результате приема OVA. Состояние группы PD не было осложнено приемом OVA. Все группы крыс были стимулированы приемом OVA в дозе 100 мг/мл за 24 часа до окончания дня № 52, а затем умерщвлены для последующих экспериментов.

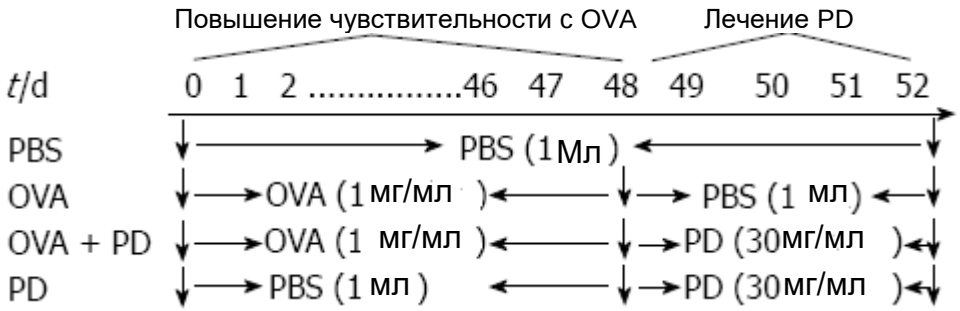

Рис. 1. Протокол повышения чувствительности пищеварительного тракта (овальбумином) и лечения Формулой 3.
У крыс повышали чувствительность пищеварительного тракта с помощью овальбумина (OVA). (Каждая крыса ежедневно получала 1 мг/мл × 1 мл внутрижелудочно в течение 48 дней). В группе лечения полидатином (PD) крысы получали PD в рот (30 мг/мл × 1 мл ежедневно), начиная с 49-ого дня по 52-ой день после начала приема OVA. Состояние всех крыс во всех группах было ухудшено приемом OVA в дозе 100 мг/мл за 24 часа до окончания 52-ого дня. Затем крысы были умерщвлены.
* PBS: Физиологический раствор с фосфатным буфером.

Окрашивание гематоксилином и эозином тканей тонкого кишечника

Части тонкого кишечника, относящиеся к тощей кишке, были изолированы из тканей крыс и погружены в парафин. Были подготовлены срезы по 7 мм, и их подвергли окрашиванию HE (гематоксилином и эозином), как сообщалось в предыдущей работе [17].

Измерения сократимости гладкой мускулатуры

Степень сократимости гладкой мускулатуры измерялась, как сообщалось в предыдущей работе [18]. Если изложить процедуру вкратце, были вырезаны сегменты тонкого кишечника 2 мм длиной от верхней части тощей кишки до нижней части подвздошной кишки. Они были подвешены на треугольные крючки. Верхним концом крючки были соединены с датчиками, а нижним концом вставлены в просвет кишечника. Это позволяло кольцевой мышце сокращаться. Эти сегменты тканей инкубировались в камерах, содержащих 20 мл раствора Тироде (136 ммоль/л NaCl, 5.4 ммоль/л KCl, 1.0 ммоль/л $MgCl_2$, 0.33 ммоль/л NaH_2PO_4, 1.8 ммоль/л NaCl, 10.0 ммоль/л глюкозы и 5.0 ммоль/л HEPES). Камеры содержались при температуре 37°C и постоянно газировались смесью, состоящей на 95% из кислорода и на 5% из углекислого газа. Первоначально нагрузка на мышцу была установлена на значение 1.0 г, и от этой нагрузки сегменты ткани со временем спонтанно релаксировали. Сегментам дали 30 минут на то, чтобы стабилизироваться перед 3-минутной стимуляцией их дозой OVA (1 мг/мл). Определялся параметр R*0* – среднее базальное натяжение, когда сегменты находятся в состоянии отдыха. ΔR обозначает разность (R1-R0), где R1 – сила натяжения при сокращении сегментов, когда они находятся под стимуляцией OVA.

Краситель Толуидин синий

Типичные мастоциты в тканях тонкого кишечника крыс или раствор перитонеального смыва (RPLS) были окрашены красителем толуидин синий, как было ранее описано в работе [19]. Если описать процедуру вкратце, 200 л раствора RPLS осушалось воздухом на предметных стеклах, обработанных предварительно кромогликатом натрия. Затем на стекла наносили несколько капель раствора красителя (это был толуидин синий, растворенный в 70%-ном этаноле). Спустя 90 секунд, раствор красителя быстро смывался под проточной струей воды, и окрашенные клетки изучались и подсчитывались под световым микроскопом (Olympus, Япония).

Ферментный иммуносорбентный тест (ELISA)

Содержание интерлейкина-4 (IL-4) (компания eBioscience Inc., штат Калифорния, США) и гистамина (компания R & D Inc., штат Миннесота, США) в растворе RPLS и в сыворотке крови определялось с помощью купленных наборов для проведения ферментного иммуносорбентного теста (ELISA) с помощью пар антител в соответствии с инструкциями производителя. Уровни IgE в сыворотке крови также проверялись с помощью купленного набора ELISA (производитель – компания BD Pharmingen, штат Калифорния, США) в соответствии с инструкциями производителя.

Изоляция брюшинных мастоцитов крысы

Крысы породы BN были умерщвлены с применением анестезии в виде ингаляции эфира, содержащегося в воздухе. Крысиные брюшинные мастоциты (клетки RPMC) были получены путем получения перитонеального смыва и очищены путем фракционирования по градиенту плотности, как описано ранее [20,21]. Изолированные препараты клеток RPMC , содержавшие > 98% мастоцитов и по меньшей мере, 98% этих клеток были жизнеспособны, как показала проверка, проведенная путем метахроматического окрашивания в 0.05%-ном красителе толуидин синий.

Визуализация Ca^{2+} с помощью софокусного микроскопа

Внутриклеточный сигнал Ca^{2+} измерялся, как описано ранее [22], но с небольшой модификацией. Клетки RPMC или клетки RBL-2H3 инкубировались с 5 μмоль/л флуоресцентного красителя для Ca^{2+} (fluo-4 AM) (компания Invitrogen, штат Калифорния, США). Инкубация происходила 30 минут при комнатной температуре. После троекратного промывания раствором Тироде при температуре $37^{O}C$ был предусмотрен перерыв на 30 минут, в течение которого происходили реакции, в результате которых краска внутри клеток выходила из состава сложного эфира. Было определено, что около 95% флуоресцентного красителя задерживалось в цитоплазме. Флуоресцентные следы Ca^{2+} были получены с помощью софокусного микроскопа Olympus 1000 с масляно-иммерсионным объективом 40× (NA 1.3) (Olympus, Япония). Сигнал, окрашенный fluo-4, возбуждался на длине волны 488 нм и испускался на длине волны > 505 нм. Были получены снимки кадровой развертки на частоте квантования сигнала 15 мсек/кадр и 20 сек в интервал.

Снимки были проанализированы в режиме офлайн с помощью программного приложения fv10-asw.2.1. Из каждого комплекта снимков один выбранный снимок использовался как шаблон для обозначения интересующего региона (ROI) внутри каждой клетки. Интегрированная внутриклеточная концентрация Ca^{2+} определялась путем вычисления ΔF/F0. Параметр F0 определялся как средняя интенсивность базальной флуоресценции краски, записанная в течение первых 5-10 кадров развёртки, когда клетки находились в состоянии покоя. Параметр ΔF обозначает разность (F-F0), где F – временная интенсивность флуоресценции. Значения отношения ΔF/F0 внутри каждой ROI откладывались на графике как функция времени (типичное время отклика Ca^{2+} на стимул, которым выступал тапсигаргин или DNP-BSA в единичных клетках RBL-2H3).

Амплитуда ответа Ca^{2+} внутри каждой клетки определялась как пик отношения ΔF/F0, достигаемый в течение периода измерения, осредненный по всем клеткам внутри каждой группы.

Статистический анализ

Данные представлены как средние значения ± SE (стандартное отклонение). Когда мы получали два сравнения, использовался непарный двусторонний t-критерий Стьюдента. Для множественных сравнений, для анализа использовался односторонний вариационный анализ повторных изменений и критерий множественного сравнения Стьюдента-Ньюмана-Кейлза. Значение вероятности $P < 0.05$ считалось статистически значимым.

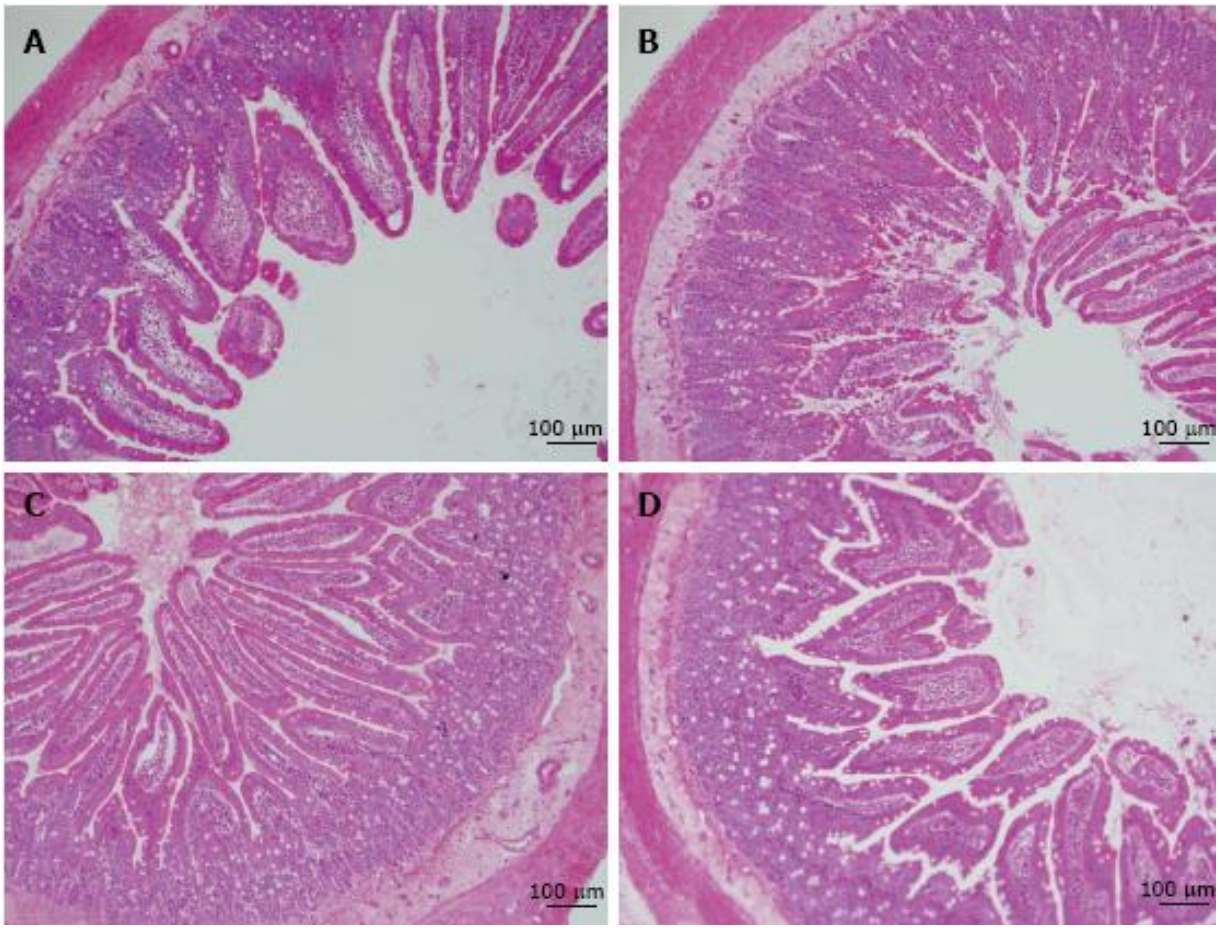

Рис. 2 Ослабленное полидатином повреждение ткани в тонком кишечнике, вызванное овальбумином (приведшим к повышенной чувствительности пищеварительного тракта). A: Группа, получавшая физиологический раствор с буферным фосфатом; B: Группа, получавшая овальбумин (OVA); C: Группа OVA + полидатин (PD); D: Группа PD. Морфология тощей кишки была проанализирована путем окрашивания гематоксилином и эозином. Показаны репрезентативные снимки, выбранные из трех независимых экспериментов. (Увеличение × 63).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Ослабленное полидатином повреждение, причиненное OVA, вызывало аномалию в тканях тонкого кишечника у крыс

В данном исследовании использовался 1 мг OVA, который давали крысам породы BN в рот, для того, чтобы вызвать у них в пищеварительном тракте повышенную чувствительность и получить модель пищевой аллергии, как описано в предыдущих работах [16,23]. Потеря целостности мукозного барьера – основная причина пищевой аллергии [24]. Таким образом, мы изолировали из тонкого кишечника фракции тощей кишки и проверили степень повреждения ткани путем окрашивания HE. Как показано на Рис. 2, результаты выявили, что в группе OVA кишечная мукоза была сильно повреждена: кишечные ворсинки эродированы, присутствуют отеки и последняя стадия тромбоцитопоэза (образование тромбоцитов из мегакариоцитов), и множество кишечных ворсинок значительно редуцированы. Эта морфологическая аномалия тонкого кишечника, явившаяся следствием повышения чувствительности из-за приема OVA, была существенно ослаблена применением PD.

О корреляции между кишечной аллергией и сократительной способностью гладкой мускулатуры говорит тот факт, что контакт с аллергеном кишечного просвета вызывает состояние гипер-реактивности отделов, близких к тонкому кишечнику [25,26]. Чтобы оценить действие PD на сократительную способность кишечника, в каждой

группе были подготовлены сегменты кишок по 2 см длиной. В инкубаторе органов, в который были помещены эти сегменты гладкой мускулатуры, определялась сила сокращения кишечной ткани. В ответ на применение 1 мг/мл OVA, кишечные сегменты, изолированные из крыс с искусственной аллергией, вызванной OVA, показывали существенно более высокую силу сокращения, чем в группе, получавшей раствор PBS. Увеличение силы сокращения ткани, вызванное повышенной чувствительностью из-за приема OVA, было значительно ослаблено применением PD (приблизительно на 42%) (Рис. 3).

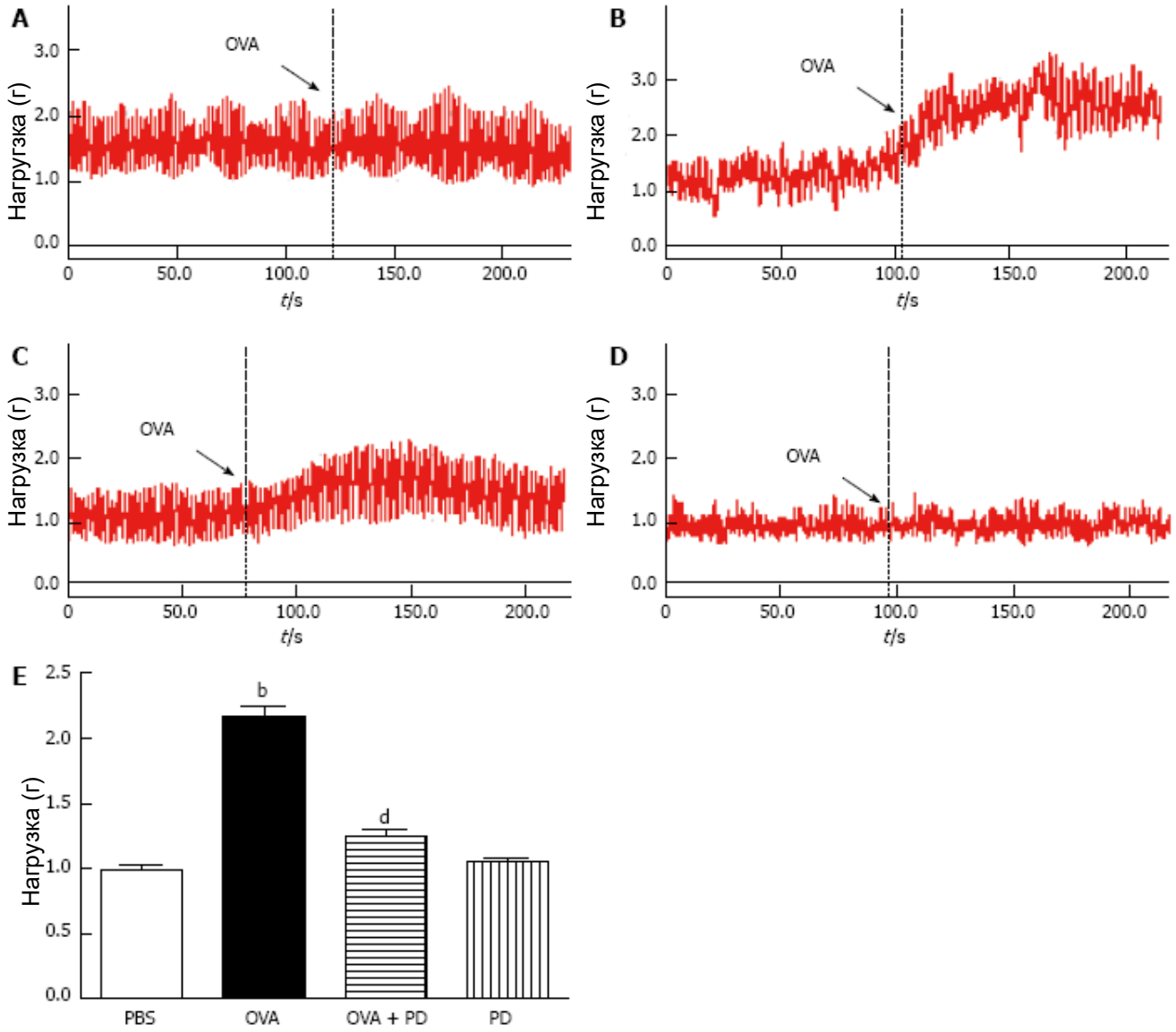

Рис. 3. Ослабленная полидатином гипер-реактивность в тонком кишечнике у крыс с вызванной овальбумином аллергией. A: Группа физиологического раствора с фосфатным буфером (PBS); B: Группа овальбумина (OVA); C: Группа OVA + полидатин (PD); D: группа PD.
n = 8, bP < 0.01 по сравнению с группой PBS; dP < 0.01 по сравнению с группой OVA. Сила кишечных сокращений измерялась нагрузкой на гладкую мускулатуру в инкубаторе органов. Приведены кривые типичных сокращений (A-D), и показана пиковая сила сокращений в каждой группе (E).

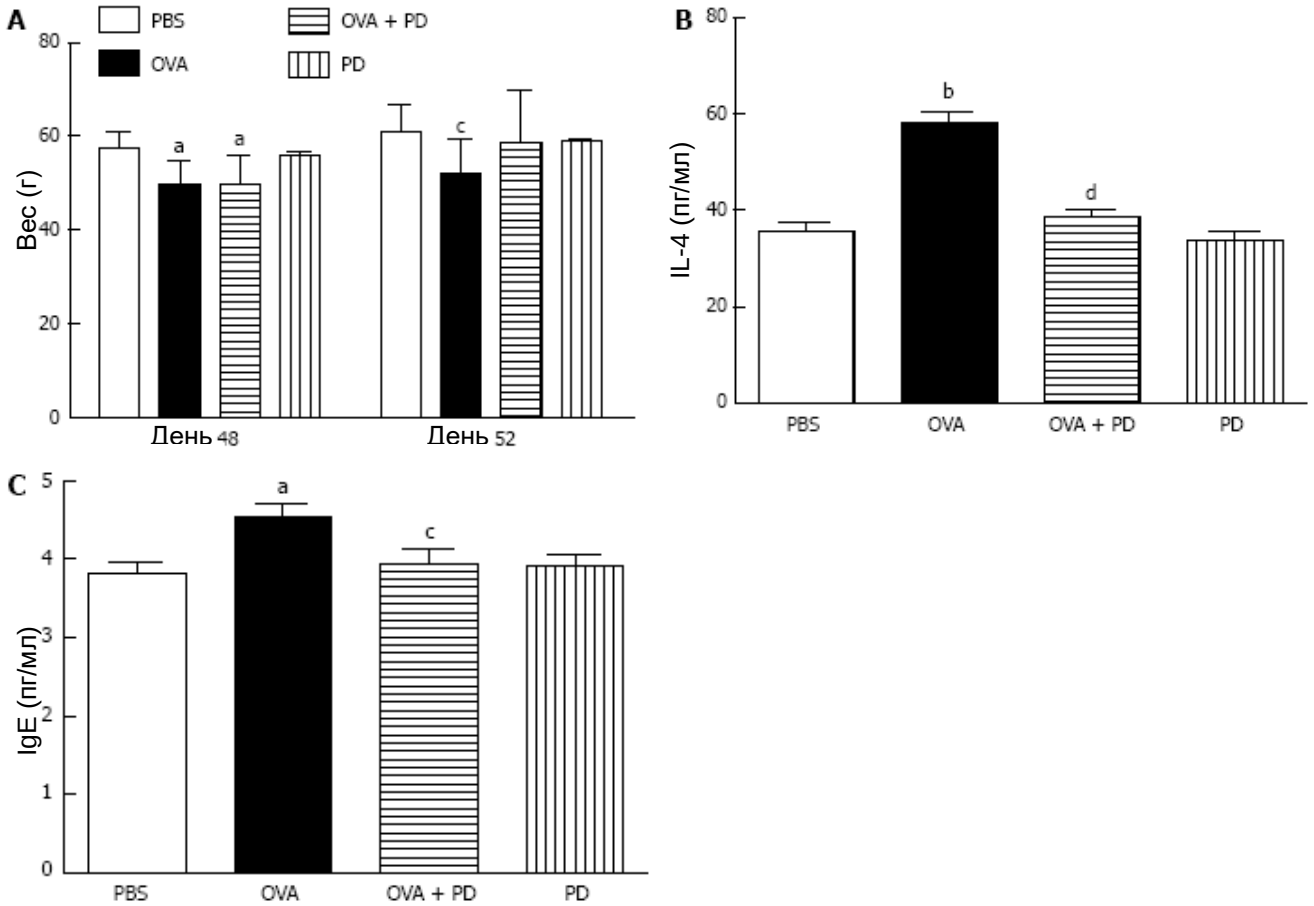

Рис. 4. Полидатин подавляет выделение интерлейкина-4 и выработку иммуноглобулина E у крыс с аллергией, вызванной овальбумином. A: Вес тела крыс на 48-ой день (слева, до лечения полидатином) и на 52-ой день (справа, после лечения PD); B: Уровни цитокинов в тканях тонкого кишечника крыс или в растворе периотонеального смыва, проанализированные с помощью ферментного иммуносорбентного теста; C: Статистический анализ содержания специфичного к овальбумину (OVA) иммуноглобулина E (IgE) в сыворотке крови, взятой у аллергических крыс из различных групп – с лечением PD или без него. n = 8. aP < 0.05, bP < 0.01 по сравнению с группой физиологического раствора с фосфатным буфером (PBS); cP < 0.05, dP < 0.01 по сравнению с группой OVA.

Лечение PD уменьшало уровни IL-4 и ослабляло выработку IgE в группе повышенной чувствительности, вызванной приемом OVA

Вес тела всех крыс в каждой группе измерялся в дни №№ 0, 48 и 52. Мы обнаружили, что базальные уровни веса тела в день №0 были одинаковы во всех четырех группах. По сравнению с группой, получавшей раствор PBS, повышение чувствительности с помощью OVA существенно снижало вес тела в день № 48 (Рис. 4A, слева).

Через 4 дня после лечения PD, по параметру веса тела не было существенных различий между группой, получавшей раствор PBS и группой OVA + PD (Рис. 4A, слева), что указывает на то, что лечение PD может поддерживать вес тела у аллергических крыс на нормальном уровне. Уровни цитокинов в супернатанте мукозы кишечника измерялись с помощью теста ELISA. Результаты показали, что концентрация IL-4 в группе OVA была значительно выше, чем в контрольной группе (OVA: 58.15 ± 6.24 пг/мл; контрольная группа: 35.51 ± 5.48 пг/мл) (Рис. 4B). Лечение PD ослабляло повышенное содержание IL-4 на 34%. Между тем анализ ELISA показал, что в группе OVA концентрация специфичного к OVA иммоглобулина IgE в сыворотке крови была повышена в 1.2 раза, и терапия PD вернула ее к нормальному уровню (Рис. 4C).

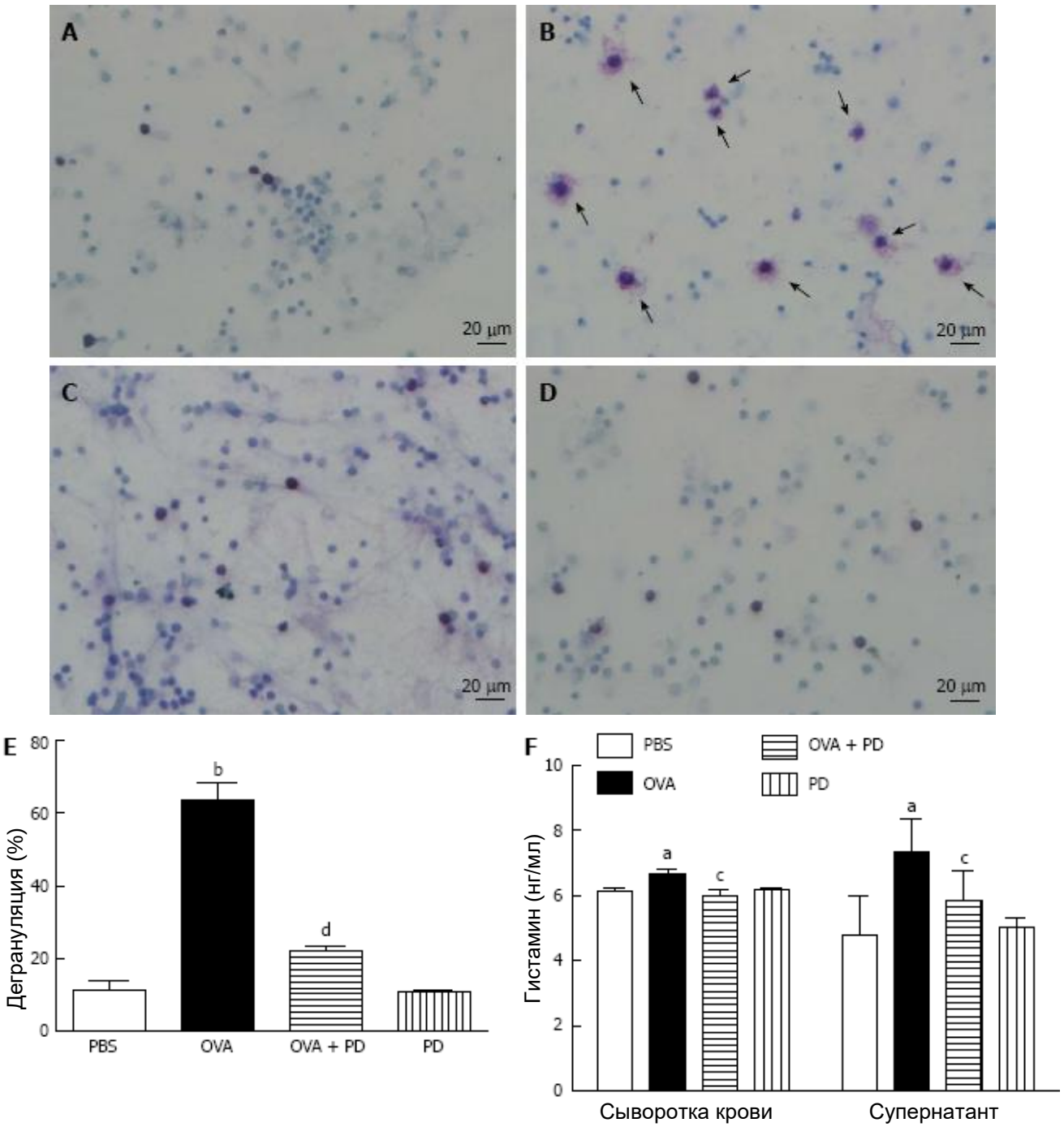

Рис. 5. Лечение полидатином снижает дегрануляцию и активацию мастоцитов. A: Группа, получавшая физиологический раствор с фосфатным буфером (PBS); B: Группа овальбумина (OVA); C: Группа OVA + полидатин; D: Группа PD; E: Дегранулированных мастоцитов было насчитано всего, по меньшей мере, 500 клеток, а процент дегрануляции подсчитывался как отношение числа дегранулированных клеток к общему числу клеток; F: Слева - выделение гистамина в сыворотке крови в тканях тонкого кишечника у крыс, справа – раствор перитонеального смыва; измерение проводилось с помощью ферментного иммуносорбентного теста. n = 8, aP < 0.05, bP < 0.01 по сравнению с группой PBS; cP < 0.05, dP < 0.01 по сравнению с группой OVA. Количество мастоцитов в тканях тонкого кишечника крыс или в растворе перитонеального смыва подсчитывалось с помощью окрашивания красителем толуидин синий. Мастоциты считались дегранулированными, если имелось, по меньшей мере, 5 гранул за пределами клетки. Стрелки указывают на дегранулированные мастоциты (Увеличение, × 250).

PD снижает активацию и дегрануляцию мастоцитов в тонком кишечнике

Дегрануляция мастоцитов и выделение гистамина – основные факторы развития пищевой аллергии. Число и морфология мастоцитов в тканях тонкого кишечника крыс

(данные не показаны) в растворе RPLS были изучены с помощью окрашивания красителем толуидин синий. В группе OVA число и размер мастоцитов были существенно больше. Кроме того, наблюдалось большее стягивание клеточной мембраны, пузыри в цитоплазме и признаки дегрануляции вокруг клеток (Рис. 5A-D). В экспериментах *in vivo* прием PD в течение 4 дней до умерщвления повернуло вспять повреждение в мастоцитах, причиненное OVA. Процент дегранулированных мастоцитов, как показывает анализ числа гранул вокруг клеток (по меньшей мере, пять) резко увеличивается в группе OVA (в 5.5 раз) и падает на 65% после лечения PD (Рис. 5E). Обусловленное PD ослабление дегрануляции мастоцитов было, кроме того, подтверждено и снижением уровней гистамина. Было обнаружено, что выделение гистамина как в сыворотке крови, так и в растворе RPLS было существенно увеличено в группе OVA (группе пищевой аллергии), и тяжесть заболевания была ослаблена PD-терапией приблизительно на 11% (в сыворотке крови) и 20% (в растворе RPLS) (Рис. 5F).

PD ингибировал дегрануляцию мастоцитов путем модулирования мобилизации Ca^{2+} через канальцы SOC

В настоящее время хорошо известно, что быстрое перемещение Ca^{2+} играет важную роль в дегрануляции мастоцитов [27]. В модели пищевой аллергии мы также обнаружили, что активация мастоцитов связана со стимуляцией мобилизации Ca^{2+} (данные не опубликованы). Для исследования механизма, лежащего в основе ингибиторного действия PD на дегрануляцию мастоцитов, мы изолировали клетки RPMC и отслеживали внутриклеточный Ca^{2+} с помощью флуоресцентного красителя fluo-4 (5 моль/л). Использовался стандартный для исследования перемещения Ca^{2+} тест с добавлением реагентов, а именно введение тапсигаргина (TG), блокирующего АТФазу кальция в саркоплазматической (образующей мышечную ткань) и эндоплазматической сети (насос Ca^{2+}). TG вводился во внеклеточный раствор, свободный от Ca^{2+}, и в результате внутриклеточные запасы Ca^{2+} были истощены. После этого внеклеточная концентрация Ca^{2+} возвращалась к уровню 2 ммоль/л [28]. При использовании этого протокола введение TG вызывало два пика Ca^{2+}, где первый был представлен выделением Ca^{2+} в эндоплазматическую сеть (ER), а второй поступлением Ca^{2+} по активированным канальцам SOC.

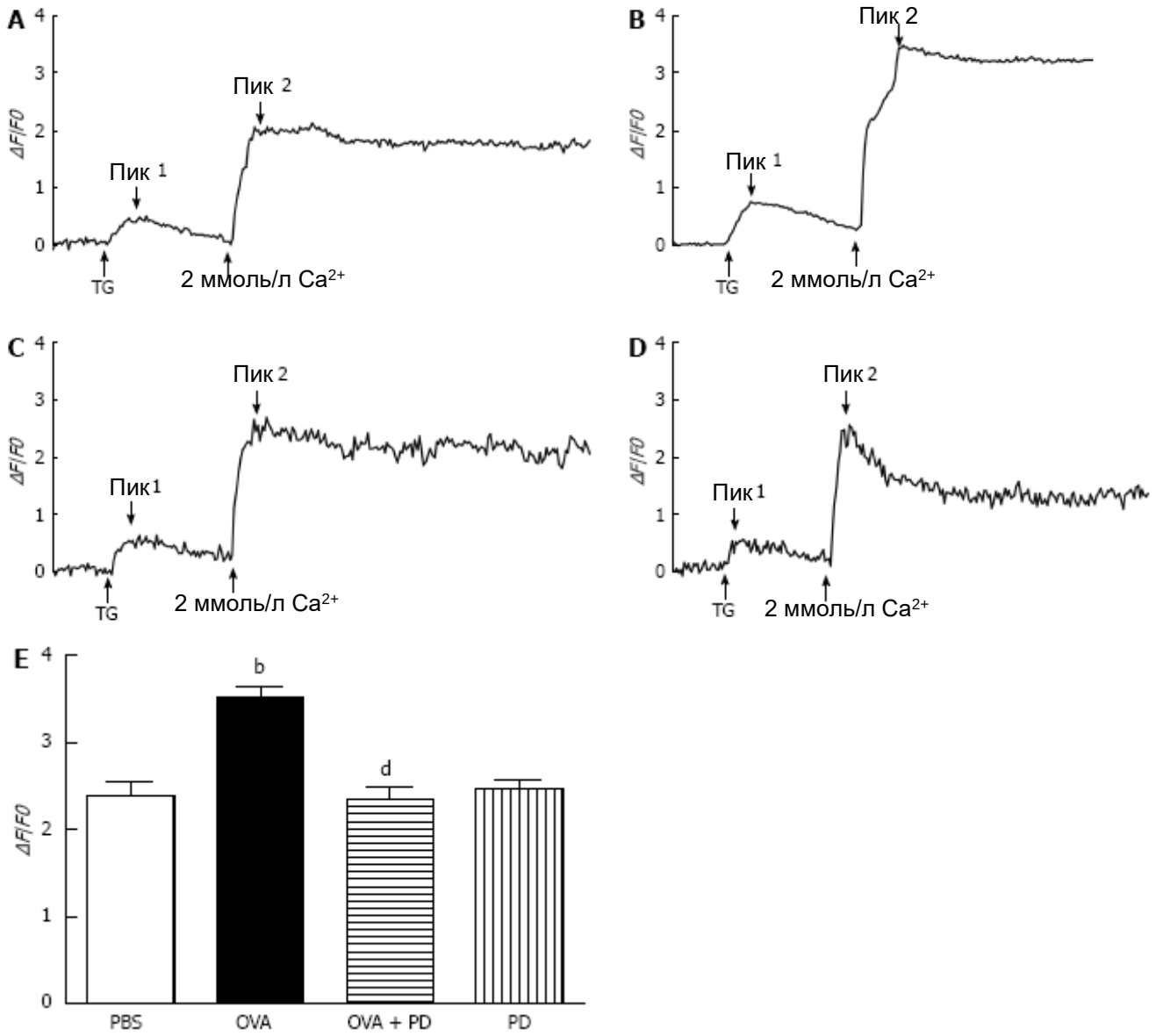

Рис. 6. Полидатин снижает поступление Ca^{2+} через регулирующие запасы кальция в клетках канальцы в мастоцитах крыс с пищевой аллергией. Типичные ответные реакции на спровоцированное тапсигаргином (TG) поступление Ca^{2+} в клетки по регулирующим в них запасы кальция канальцам в брюшинных мастоцитах крыс (клетки RPMC). A: Группа физиологического раствора с фосфатным буфером (PBS);
B: Группа овальбумина (OVA); C: Группа OVA + полидатин; D: Группа PD;
E: Средняя амплитуда пиков поступления Ca^{2+} в клетки (второй пик) в соответствии с записями, сделанными в каждой группе. bP < 0.01 по сравнению с группой PBS; dP < 0.01 по сравнению с группой OVA. Клетки RPMC были изолированы из тканей крыс породы Brown-Norway, прошедших или не прошедших лечение полидатином (PD). Внутриклеточное содержание Ca2+ подсчитывалось путем применения флуоресцентного красителя fluo-4. Суммарное количество клеток в каждой группе - 40-50, клетки были получены в четырех независимых экспериментах.

Как показано на первых пиках на Рис. 6A-D, когда клетки находились в растворе, свободном от Ca^{2+}, спровоцированная TG амплитуда Ca^{2+} была почти одинаковой во всех группах, что указывает на то, что количества Ca^{2+}, выделяющиеся из ER приблизительно одинаковы. В присутствии 2 ммоль/л внеклеточного Ca^{2+} спровоцированный TG входящий поток Ca^{2+} резко усиливался (в 1.5 раза) в клетках RPMC, чья чувствительность была повышена из-за приема OVA, в то время как лечение PD снижало поступление Ca^{2+} до нормального уровня. Эти результаты указывают на то, что PD ослабляет повышенный из-за OVA входящий через канальцы SOC поток Ca^{2+}.

ОБСУЖДЕНИЕ

О влиянии ресвератрола, структурного и функционального аналога полидатина (PD), на регуляции внутриклеточной сигнализации Ca^{2+} сообщалось несколькими группами авторов, хотя результаты и варьируют для различных групп клеток [29,30]. Более того, предыдущее исследование, проведенное в нашей лаборатории, идентифицировало PD как новый стабилизатор мастоцитов при пассивном кожном анафилаксисе у мышей [15]. В нашем новом исследовании получено еще два важных результата. Во-первых, используя модель пищевой аллергии *in vivo*, мы продемонстрировали, что PD обладает терапевтическим эффектом по преодолению пищевой аллергии путем снижения стимулируемой антигеном дегрануляции мастоцитов. Во-вторых, было показано, что PD подавляет мобилизацию Ca^{2+} путем ингибирования поступления Ca^{2+} в клетки по канальцам SOC. И эти два фактора вносят весомый вклад в стабилизацию мастоцитов под влиянием PD.

Пищевая аллергия является иммунологической негативной реакцией, вызываемой пищевыми продуктами, и это касается ряда заболеваний, включая обусловленный иммуноглобулином E (IgE) анафилаксис, вызываемый пищевыми протеинами синдром энтероколита и возникающие из-за неподходящих пищевых продуктов эозинофильные желудочно-кишечные заболевания. Сообщается, что аллергены, имеющиеся в яйцах, считаются одной из наиболее частых причин пищевых аллергических реакций [31]. Таким образом, в данном исследовании мы использовали OVA для повышения чувствительности пищеварительного тракта у крыс и создания модели пищевой аллергии. У аллергического животного наблюдается аномальная кишечная морфология и повышенная сократимость гладкой мускулатуры, повышенные уровни цитокинов типа Th2 (IL-4) и повышенная концентрация специфичных к OVA иммуноглобулинов IgE. Наши результаты согласуются с другими опубликованными данными, так как уже сообщалось, что IL-4 является отличительным признаком цитокинов типа Th2 с рядом иммунологических функций, включая управление дифференциацией клеток Th2, инициацию переключения класса Ig на IgE в B-клетках и активацию распространения мастоцитов в кишечнике [32]. Также IL-4 вызывает более сильный сократительный ответ в гладкой мускулатуре кишечника [33]. Более того, были также продемонстрированы активация и дегрануляция мастоцитов, обусловленная мобилизацией Ca^{2+} по канальцам SOC.

Мастоциты являются основными эффекторными клетками в патогенезе многих аллергических заболеваний, включая астму, аллергические риниты, желудочно-кишечную аллергию и кожный анафилаксис. Большинство исследований, посвященных мастоцитам, было адресовано их доминантной роли в острых аллергических реакциях (гиперчувствительность немедленного типа), а в последние годы их роли в поздней стадии аллергических реакций [34,35]. Поэтому разработка новых лекарств, способных стабилизировать мастоциты, была бы ценным вкладом в лечение заболеваний, относящихся к I типу реакций гиперчувствительности. Уже было проведено интенсивное исследование с использованием клеточной линии мастоцитов RBL-2H3, сфокусированное на поиске перспективных лекарств, способных ингибировать активацию и дегрануляцию мастоцитов, среди которых перспективным себя показал PD [15]. В настоящем исследовании вслед за приемом PD у крыс с вызванными аномалиями в мастоцитах пищевыми аллергиями, не обнаруживалось анафилактических симптомов (данные не показаны), и у них наблюдалось заметное снижение ответных реакций типа Th2 на раздражение пищеварительного тракта с помощью OVA.

Мы обнаружили, что PD существенно снижает выработку IgE путем ингибирования выделения цитокинов типа Th2. С другой стороны, PD показал потенциал блокирования дегрануляции мастоцитов путем снижения поступления Ca^{2+} через канальцы SOC.

Важность поступления кальция для активации и дегрануляции мастоцитов уже широко признана [36]. Дегрануляция мастоцитов зависит от Ca^{2+}, а повышение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} , характеризующееся поступлением Ca^{2+} через канальцы SOC, важно для выделения гранул [13,27,37]. В данном исследовании мы обнаружили, что лечение PD существенно ослабляет внутриклеточное повышение концентрации Ca^{2+}, вызываемое рецепторами FcεRI, а это указывает на то, что PD стабилизирует мастоциты путем подавления мобилизации Ca^{2+}. Более того, мы обнаружили, что PD ингибирует поступление Ca^{2+} по канальцам SOC. В регуляцию активности канальцев SOC вовлечены многие механизмы. Недавно было обнаружено, что две регуляторные субъединицы - STIM1 и Orai1 – играют важнейшую роль как в механизмах сигнализации, так и в механизмах проникновения Ca^{2+} в клетки по канальцам SOC. Повышенная экспрессия субъединиц STIM1 и Orai1 вызывает резкое повышение поступления Ca^{2+} в клетки RBL, вызванное истощением в них запасов кальция [38]. Этот механизм, лежащий в основе обусловленного PD ингибирования активности канальцев SOC, остается неясным.

В целом представленное исследование характеризует PD как новый стабилизатор мастоцитов со способностью предотвращения патогенеза пищевой аллергии и, возможно, других связанных с аномалиями мастоцитов аллергических заболеваний путем стабилизации мастоцитов. Механизм, лежащий в основе вызываемой PD стабилизации мастоцитов, связан с ингибированием мобилизации Ca^{2+} при активации рецепторов FcεRI.

КОММЕНТАРИИ

История вопроса

Распространенность пищевых аллергий стремительно возрастает в течение последних трех десятилетий, но в настоящее время отсутствует удовлетворительный терапевтический метод, за исключением избегания аллергенов в диете. Тем не менее, проблемные продукты питания, вызывающие аллергические реакции, обычно являются источниками питательных веществ, важных для здоровья человеческого организма. Поэтому разработка нового лекарства для лечения пищевых аллергий исключительно важна. Полидатин является натуральным компонентом, изолированным из растения из семейства гречишных *Polygonum cuspidatum*, и его эффективность уже продемонстрирована в лечении аллергических заболеваний.

Масштаб исследований

Полидатин относится к натуральным биологическим материалам, и он уже использовался как лекарство в борьбе со многими заболеваниями. В области лечения полидатином аллергических заболеваний фокус исследований лежит в изучении того, как этот продукт может стабилизировать мастоциты и снижать тяжесть аллергических реакций у животных с пассивным кожным анафилаксисом. Терапевтический эффект полидатина по преодолению пищевой аллергии еще не изучен.

Инновации и научные достижения

В предыдущих исследованиях, проведенных как в других лабораториях, так и в группе исследователей под руководством автора, экстракт полидатина был идентифицирован как новый стабилизатор мастоцитов при пассивном кожном анафилаксисе у мышей, в дополнение к другим его новым терапевтическим полезным качествам, таким как противораковая активность. В исследовании на мышах была использована модель применения овальбумина для повышения чувствительности пищеварительного тракта. Авторы представляют собой первую группу исследователей, которая продемонстрировала, что полидатин может ослаблять пищевую аллергию путем снижения дегрануляции мастоцитов. Более того, было показано, что полидатин подавляет мобилизацию Ca^{2+} путем ингибирования поступления Ca^{2+} в клетки по регулирующим запасы кальция в клетках канальцам, и этот фактор является крупным

вкладом в стабилизацию мастоцитов под действием полидатина.

Область применения

Данные результаты указывают на то, что полидатин потенциально может выступать как терапевтическое лекарство, которое можно использовать в терапии пищевой аллергии.

Терминология

Пищевая аллергия, обусловленная реакцией выделения или не-выделения иммуноглобулина E (IgE), является негативным для здоровья эффектом, возникающим из специфического иммунного ответа, который появляется неоднократно в ответ на конкретный пищевой продукт. Это понятие охватывает ряд заболеваний, включая IgE-обусловленный анафилаксис, вызванный пищевыми протеинами синдром энтероклита и вызываемые пищевыми продуктами эозинофильные желудочно-кишечные заболевания. Полидатин, также известный как *polygoni cuspidate radix*, является натуральным компонентом, изолированным из растения из семейства гречишных *Polygonum cuspidatum*. С точки зрения химического состава он был определен как ресвератрол глюкозид со следующей молекулярной структурой: 3,4,5-тригидроксистильбен-3-D-моно-D-глюкозид. Полидатин традиционно используется в Южной Корее, Китае и Японии как народное средство против дисменореи, кожных ожогов, камней в желчном пузыре, гепатита, воспалений и остеомиелита.

Отзывы коллег

Авторы исследовали действие полидатина (глюкозида ресвератрола) на дегрануляцию мастоцитов и анти-аллергическую активность. Статья представляет интерес.

ЛИТЕРАТУРА