

УДК: 576.32/.36:611.018.24:611.33.018.74:57.047:616-092.9

І.О. Топол,

О.М. Камишиний

Запорізький державний медичний
університет

ЗМІНИ ТРАНСКРИПЦІЙНОЇ АКТИВНОСТІ ГЕНІВ NR3C1 І ADRB2-РЕЦЕПТОРІВ, ПРОЗАПАЛЬНИХ ЦИТОКІНІВ ТА NLRP3- ІНФЛАМАСОМИ В КИШКОВО-АСОЦІЙО- ВАНІЙ ЛІМФОЇДНІЙ ТКАНИНІ ЩУРІВ В УМОВАХ ХРОНІЧНОГО СОЦІАЛЬНОГО СТРЕСУ

Ключові слова: хронічний соціальний стрес, Nr3c1, Adrb2, ІЛ-1 β , ІЛ-17a, Nlrp3.

Резюме. В експерименті досліджувався вплив хронічного соціального стресу (ХСС) на рівень експресії мРНК Nr3c1 і Adrb2-рецепторів, прозапальних цитокінів та Nlrp3 - інфламасоми імунними клітинами кишково-асоційованої лімфоїдної тканини (КАЛТ) у щурів. Виділення тотальної РНК проводили з допомогою "Trizol RNA Prep100" (Ізоген Lab., LTD, Росія); для проведення зворотної транскрипції і отримання кДНК використовували набір ОТ-1 "Синтол" (Росія). Для визначення рівня експресії мРНК генів Nr3c1, Adrb2, ІЛ-1 β , ІЛ-17a та Nlrp3 проводили ЗТ-ПЛР в реальному часі на ампліфікаторі CFX96™ Real-Time PCR Detection Systems ("Bio-Rad Laboratories, Inc.", США). Відносний рівень експресії вищевказаних генів оцінювали за методом $\Delta\Delta C_t$, нормалізуючи за референс-геном GAPDH. Встановлено, що розвиток ХСС призводив до значного зниження вмісту мРНК досліджуваних генів Nr3c1 та Adrb2, а також супроводжувався транскрипційною індукцією генів прозапальних цитокінів ІЛ-1 β і ІЛ-17a та Nlrp3-інфламасоми в КАЛТ щурів. Це, в свою чергу, може істотно вплинути на баланс субпопуляції Т-клітин та ініціювати розвиток запальних і автоімунних захворювань.

Вступ

Хронічний соціальний стрес (ХСС) є невід'ємною частиною сучасного життя [15]. Стрес-індукована імунна дизрегуляція призводить до значних негативних наслідків для здоров'я, збільшуючи ризик розвитку вірусних інфекцій, хронічних автоімунних і запальних захворювань [15, 17]. Так, у багатьох клінічних та експериментальних дослідженнях було показано, що ХСС може бути тригером розвитку патологічних станів, включаючи цукровий діабет 1 типу (ЦД 1 типу) і запальні захворювання кишківника (ЗЗК). У свою чергу, головними ефекторними гормонами під час стрес-реакції є глюкокортикоїди (ГК) та катехоламіни (КХ), а зміни рівня експресії їх рецепторів Nr3c1 і Adrb2 можуть призводити до резистентності до ГК та КХ і пояснити перевагу прозапальної сигналізації в умовах ХСС всупереч класичній парадигмі стресу. Відомо, що імункомпетентні клітини мають рецептори до ГК і КХ, і завдяки цій обставині можливий прямий вплив цих гормонів на функціональні елементи як вродженого, так і адаптивного імунітету та їх участь у регуляції імунної відповіді в умовах ХСС [18]. Крім того, Nr3c1 може функціонувати

як транскрипційний фактор та зв'язуватися зі специфічними, чутливими до ГК ділянками ДНК (glucocorticoid-responsible elements, GRE), розташованими в промоторних ділянках генів і активувати їх транскрипцію, так і в якості регулятора активності інших транскрипційних факторів [12].

У наших попередніх роботах було встановлено, що розвиток ХСС супроводжується зростанням кількості TLR2+ і TLR4+ лімфоцитів у кишково-асоційованій лімфоїдній тканині (КАЛТ), змінює баланс TLR2+/TLR4+-клітин, посилює експресію Nf-kB, що закономірно повинно підвищувати тут продукцію прозапальних цитокінів. Для підтвердження цієї гіпотези ми з'ясували рівень експресії в КАЛТ найбільш "агресивних" цитокінів - ІЛ-1 β і ІЛ-17a, а також Nlrp3-інфламасоми. Nlrp3 відповідальна за активацію каспази-1 і сприяє дозріванню найбільш активного прозапального цитокіну ІЛ-1 β , а її підвищена експресія пов'язана з розвитком багатьох автоімунних і запальних захворювань [13]. Інтригують також дані щодо здібностей глюкокортикоїдів в умовах стресу активувати утворення Nlrp3-інфламасоми [3].

Мета дослідження

Вивчити рівень експресії мРНК NR3C1 і ADR β 2, прозапальних цитокінів ІЛ-1 β , ІЛ-17а та Nlrp3-субодиниці інфламасоми в КАЛТ в умовах ХСС у щурів лінії Wistar.

Матеріал і методи

Дослідження проводили на 45 самках щурів лінії Wistar, які були розділені на 3 експериментальних групи: контрольні щури (група 1); щури, яким моделювали ХСС1 шляхом тритижневої соціальної ізоляції і тривалого психоемоційного впливу (ПЕВ), що припускав перманентне проживання самок в "агресивному середовищі", а саме - через перфоровану перегородку в клітці з агресивним самцем, який щодня вступав у конфронтації з підсадженим до нього іншим самцем (група 2); щури, яким моделювали ХСС2 шляхом утримання тварин у перенаселених клітках (20 щурів на клітку) впродовж 3 тижнів із щоденною зміною угруповання, при якому піддослідну самку кожний день поміщали до нової збалансованої та перенаселеної колонії (група 3).

Об'єктом дослідження в експериментальних тварин були згруповані лімфоїдні вузлики (ЗЛВ) клубової кишки, які поміщали в фіксатор Буена, проводили дегідратацію у висхідних концентраціях етанолу і укладали в парафінові блоки. Молекулярно-генетичні дослідження проведені на архівному матеріалі віком 3 роки. РНК отримували з гістологічних зрізів завтовшки 15 мкм, для цього проводили їх депарафінізацію в ксилолі та регідратацію в низхідних концентраціях етанолу (100%, 96%, 70%). Виділення тотальної РНК проводили з використанням набору "Trizol

RNA Prep 100" (Ізоген Lab., LTD, Росія), який містить Trizol reagent (лізуючий реагент, до складу якого входить денатуруючий агент гуанідинтіоціонат та фенол із рН = 4.0) та ExtraGene E (суспензія суміші іонообмінників). РНК виділяли згідно протоколу до набору.

Для проведення зворотної транскрипції і отримання кДНК використовували набір ОТ-1 фірми "Синтол" (Росія). Реакційна суміш загальним обсягом 25 мкл містила 1 мкл Random-6 праймера, 2 мкл тотальної РНК, 8,5 мкл деіонізованої Н₂О, очищеної від нуклеаз, 12,5 мкл 2,5х реакційної суміші та 1 мкл ревертази MMLV-RT. Зворотню транскрипцію проводили при 45°C впродовж 45 хвилин із наступним нагріванням для інактивації MMLV-RT протягом 5 хв. при 92°C.

Для визначення рівня експресії досліджуваних генів використовували ампліфікатор CFX96™Real-Time PCR Detection Systems ("Bio-Rad Laboratories, Inc.", США) і набір реактивів Maxima SYBR Green/ROX qPCR MasterMix (2X) (ThermoScientific, США). Фінальна реакційна суміш для ампліфікації включала барвник SYBR Green, ДНК - полімераза Maxima HotStartTaq DNA Polymerase, по 0,2 мкл прямого і зворотного специфічних праймерів, 1мкл матриці (кДНК). Реакційну суміш доводили до загального обсягу 25 мкл додаванням деіонізованої Н₂О. Специфічні пари праймерів (5'-3') для аналізу досліджуваних і референсного генів були підібрані за допомогою програмного забезпечення PrimerBlast (www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast) та виготовлені фірмою Metabion (Німеччина) (табл.).

Після початкової денатурації протягом 10 хв. при 95°C ампліфікація складалася з 45-50 циклів

Таблиця

Ген	Праймер	T _m , °C	Product length (bp)	Exon junction
<i>Nr3c1</i>	F = CACAGCTCACCCCTACCTTG R = GGGTTCAATCACCTCCAGCA	60 60	47	
<i>Adrb2</i>	F = ACAGACTACACAGGGGAGCA R = CTCCTGCCCCAGCTGATATG	60 60	45	
<i>Il17a</i>	F = CTGGACTCTGAGCCGCAATG R = TGCCTCCCAGATCACAGAAG	61 59	58	297/ 298
<i>Il1b</i>	F = TCTTTGAAGAAGAGCCCGTCC R = GGTTCGTCATCATCCCACGAG	60 60	48	354/ 355
<i>Nlrp3</i>	F = AGCTAAGAAGGACCAGCCAG R = CGTGCATGCATCATTCCACTC	59 60	40	713/ 714
<i>GAPDH</i>	F = GCCTGGAGAAACCTGCCAAG R = GCCTGCTTCACCACCTTCT	61 60	52	825/ 826

та проводилася за таких умов: денатурація - 95°C, 15 сек., отжиг -59-61°C, 30-60 сек., елонгація - 72°C, 30 сек. В якості референс-гену для визначення відносного значення зміни рівня експресії досліджуваних генів був використаний ген глицеральдегід-3-фосфат дегідрогенази (GAPDH). Відносну нормалізовану кількість кДНК таргетних генів визначали за методом $\Delta\Delta$ Ct. Статистичний аналіз даних ПЛР проводили за допомогою програмного забезпечення CFX Manager™ (Bio-Rad, США).

Обговорення результатів дослідження

Дослідження експресії Nr3c1 та Adrb2 в КАЛТ клубової кишки показало, що розвиток ХСС призводив до значного зниження вмісту мРНК досліджуваних генів (Nr3c1 - в 3,1 раза ($p < 0,05$) при ХСС1 та в 10 разів ($p < 0,01$) при ХСС2

(Рис. 1А); Adrb2 - у 12,5 раза ($p < 0,02$) при ХСС1 та в 10,1 раза ($p < 0,01$) у випадку ХСС2 (Рис. 1С)) порівняно з контрольною групою щурів. Крім того, в нашому дослідженні виявлено, що ХСС супроводжується транскрипційною індукцією генів прозапальних цитокінів ІЛ-1 β і ІЛ-17а, а також Nlrp3-інфламасоми в КАЛТ щурів, більш виразною при ХСС1. Зокрема, проведене дослідження показало односпрямовану динаміку зростання транскрипційної активності генів Nlrp3-інфламасоми (в 17 разів ($p < 0,05$) при ХСС1 і в 2,2 раза ($p < 0,05$) при ХСС2, Рис.1 D); ІЛ-1 β (в 6 разів ($p < 0,05$) при ХСС1 і в 2,8 раза ($p < 0,05$) при ХСС2, Рис.1 E); ІЛ-17а (в 2,3 раза ($p < 0,05$) при ХСС1 і на 50 % ($p < 0,05$) при ХСС2, Рис. 1 F) порівняно з контрольною групою тварин.

Можливими причинами розвитку резистент-

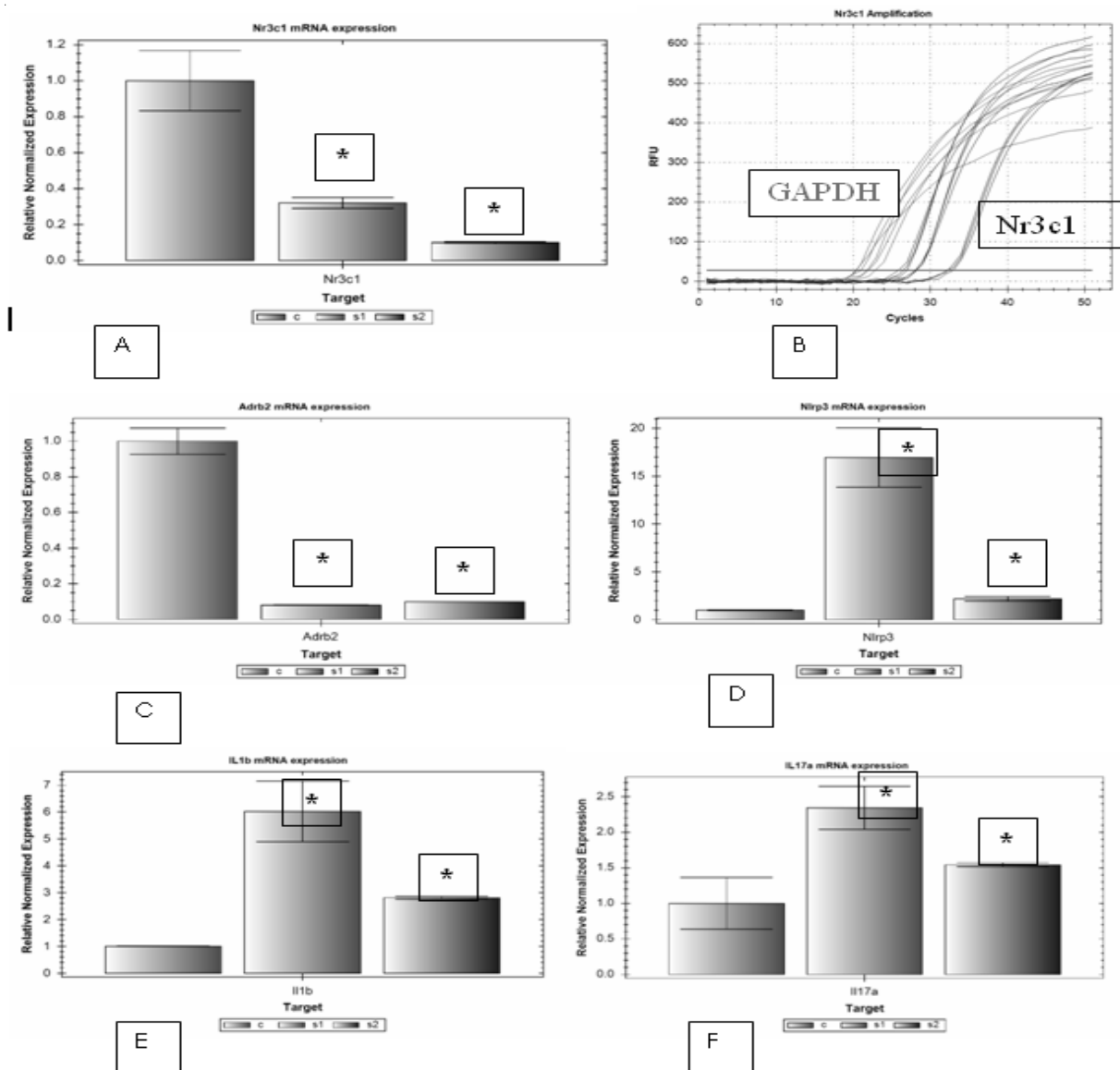


Рис. 1. Відносна нормалізована кількість кДНК гена глюкокортикоїдних рецепторів Nr3c1 (A) з графіком їх ампліфікації (B), β 2-адренергічного рецептора Adrb2 (C), Nlrp3-субодиниці інфламасоми (D), прозапальних цитокінів ІЛ-1 β (E) та ІЛ-17а (F) в клітинах КАЛТ. Нормалізація за методом $\Delta\Delta$ Ct з референс-геном GAPDH. c-контроль; s1-ХСС1; s2-ХСС2

ності до ГК в умовах ХСС є: 1) зниження рівня експресії мРНК Nr3c1; 2) генетичний поліморфізм гена Nr3c1, який може уповільнювати транслокацію рецептора в ядро, зниження його афінності до гормону чи ко-активаторів, нестабільності глюкокортикоїдного рецептора (ГР), зниження його трансактиваційної активності та ін.; 3) порушення формування гетерокомплексу ГР через зміни експресії шаперонів та ко-шаперонів, що входять до його складу, таких як Hsp90, Hsp70, Hsp56, імуномодулін, імпортин IPO13, зв'язуючих протеїнів імунофілінів FKBP51 і FKBP52, а також поліморфізм їх генів; 4) епігенетичні зміни рівня експресії мРНК ДНК-метилтрансфераз 3a і 3b, мРНК гістон-деацетилази HDAC, низки мікроРНК, зокрема мікроРНК-29b та мікроРНК-340 [7, 8, 16]. Ці причини можуть нівелювати імуносупресивні ефекти ГК, посилювати прозапальну сигналізацію в кишечнику і ще в більшій мірі індукувати резистентність до ГК. Так, відомо, що близько 20 % хворих ЗЗК (хвороба Крона, виразковий коліт) резистентні до дії ГК, що спричинено принаймні декількома механізмами: 1) гіперекспресією Р-глікопротеїну, що регулює мембранний транспорт лімфоцитами і епітеліальними клітинами кишечника; 2) конститутивною активацією епітеліоцитів прозапальними медіаторами і стимуляцією ядерного фактору карра В, що призводить до інгібування транскрипційної активності ГР [6]. Таким чином, може формуватися "вадне коло" - розвиваючись за умов ХСС глюкокортикоїдна резистентність призводить до розвитку запалення в кишечнику, а це ще в більшій мірі підсилює "толерантність" рецепторів до ГК.

Отримані нами дані підтверджуються цілим рядом інших досліджень. Так, застосування різних експериментальних моделей ХСС показало, що він може спричиняти генерацію і вихід незрілих прозапальних міелоїдних клітин, які є нечутливими до ефектів глюкокортикоїдів [7, 17]. Крім того, такі резистентні до ГК клітини продукують високі рівні ІЛ-6 та інших прозапальних цитокінів і хемокінів [17]. Як наслідок, ці стрес-індуковані зміни на клітинному рівні призводять до значних імунних (посилення імунної відповіді на мікробні і вірусні антигени і прозапальної сигналізації) і поведінкових порушень (тривожність, депресія) [1, 8].

Ряд досліджень показали, що повторний соціальний стрес викликає глюкокортикоїдну резистентність у клітинах вродженого імунітету, але молекулярні механізми цього явища повністю нез'ясовані. Так, Jung S. et al., (2015) встановив, що експресія мРНК ГК рецепторів була значно зменшена в макрофагах селезінки при ХСС. Стрес

також індукує значне зниження експресії мРНК FK506-зв'язуючого білка 52 (FKBP52) [7]. Крім того, в умовах ХСС відзначалося значне зниження експресії мРНК ДНК-метилтрансферази 3a і 3b, так само як і експресії мРНК гістон-деацетилази 2 (histone-deacetylase 2, HDAC2), а також значне зниження кількості метильованої ДНК в макрофагах селезінки. Визначення профілю мікроРНК показало, що стрес спричиняв значне підвищення експресії 9 різних мікроРНК, 6 з яких взаємодіють з мРНК рецепторів ГК, 3 - з мРНК мінералокортикоїдних рецепторів і 2 - з мРНК імунофіліну FKBP52. При цьому кореляційний аналіз показав наявність сильних кореляцій між експресією 2 мікроРНК і їх мішенню - мРНК рецепторів ГК. Надлишкова експресія мікроРНК-29b або мікроРНК-340 у клітинах лінії L929 значно знижує ЛПС-індуковану гіперекспресію рецепторів ГК. Це свідчить, що епігенетична регуляція - метилювання ДНК і експресія мікроРНК - також може відігравати певну роль в індукованій соціальним стресом резистентності до ГК.

Не менш важливими ефекторними гормонами під час стрес-реакції є КХ, а Т- і В-лімфоцити активно експресують β 2-адренергічні рецептори (Adrb2) на різних стадіях диференціювання. Так, Sanders V.M. et al. (2012) було встановлено, що активація β 2AR порушує диференціювання, проліферацію та функції Th1-клітин у результаті підвищення концентрації цАМФ в лімфоцитах, що призводить до інгібування проліферації Т-клітин і зниження продукції прозапальних ІЛ-2, ІЛ-12, TNF- α і IFN- γ і стимулює вироблення проти-запальних ІЛ-10 і TGF- β [18]. Рівень експресії β 2AR в Th1-і Th2-клітинах може регулюватися й епігенетично [11]. З іншого боку, на локальному рівні КХ можуть посилювати регіональну імунну відповідь, індукуючи продукцію ІЛ-1, TNF α і ІЛ-8. Дані деяких досліджень свідчать про те, що катехоламіни і агоністи β 2AR пригнічують проліферацію Т-клітин, індуковану мітогенами, що асоціюється з підвищенням концентрації цАМФ в лімфоцитах. Проліферативна відповідь CD8+ Т-клітин інгібується більшою мірою, ніж CD4+ Т-клітин, що пов'язано з більшою щільністю β 2AR на поверхні CD8+ лімфоцитів. Т-регуляторні лімфоцити (Treg) експресують тирозингідроксилази - ферменти, що обмежують швидкість синтезу КХ, а вивільнення КХ призводить до зниження продукції ІЛ-10 і TGF- β Т-регуляторними клітинами, а, отже, і до зменшення Treg-залежного інгібування ефекторних Т-лімфоцитів. У дослідженнях Guerreschi M.G. et al. (2013) було виявлено, що передача сигналів через β 2AR посилювала супресорну активність Treg in vitro, сприяла кон-

версії Foxp3--клітин в Foxp3+ індукційбельні і Treg клітини. Крім того, в Treg клітинах β 2AR-сигналізація збільшувала експресію негативної ко-стимуляторної молекули CTLA-4 [5]. Тому виявлене нами в роботі зниження рівня експресії мРНК β 2AR може частково пояснити причину дефіциту супресорної сигналізації, крім резистентності до ГК.

Введення агоніста β 2AR у дендритні клітини, стимульовані мікробними мурам-дипептидами через активацію рецепторів вродженого імунітету NOD2 і TLR-2, індукувало T-клітинне диференціювання в напрямку Th17, але не Th1, а співвідношення Th17/Th1 клітин було збільшеним. Це відповідає і нашим результатам щодо зростання рівня мРНК основного Th17-залежного цитокіну IL-17a [10]. Крім того, активація β 2AR на макрофагах TLR-4-залежним шляхом спричиняє індукцію NF- κ B, що регулює експресію генів усіх основних прозапальних цитокінів [9].

Виявлена нами транскрипційна індукція генів прозапальних цитокінів IL-1 β і IL-17a, а також Nlrp3-інфламасоми відповідає цілому ряду клінічних спостережень, які показали, що ХСС різної природи, включаючи соціальну ізоляцію, втрату близьких родичів, низький соціально-економічний статус, загрозливий життю діагноз та інше збільшує експресію прозапальних генів в імунних клітинах (наприклад, IL1 β , IL6, IL8, IL17A, TNF α) та зменшує експресію генів, залучених до вроджених противірусних відповідей (IFNB, IFIs, MX, OAS) [1]. Так, Powell D. et al. (2013), вивчаючи транскриптом людей в умовах ХСС, виявив різке посилення активності генів-транскрипційних регуляторів запалення в лейкоцитах (таких як PU.1, IL17A, NF- κ B, EGR1, MZF1, NRF2) [17]. Характерно, що низький соціальний статус і проживання в несприятливих умовах у ранньому віці знижує глюкокортикоїдну і збільшує прозапальну, зокрема NF- κ B-залежну сигналізацію [15].

Nlrp3-інфламасома через продукцію IL-1 β і IL-18 відіграє важливу роль у розвитку запальних захворювань, а впливаючи на диференціювання таких субпопуляцій CD4+ T-клітин як Th1, Th2, Th17 і Treg - і в індукції адаптивного імунітету [14]. Отримані нами результати опосередковано підтверджуються даними цілого ряду інших дослідників. Так, Gris D. et al. (2010) на мишачій моделі експериментального автоімунного енцефаломієліту показав значне зростання рівня експресії мРНК NLRP3, а NLRP3-дефіцитні миші демонструють різке зниження тяжкості захворювання [4]. Посилення експресії мРНК NLRP3 було показано і при запаленні тонкого кишечника, а також на моделях коліту [2], а в дослідженні

Meng et al. (2010) при аналізі CD4+ T-клітинної відповіді у мишей у результаті гіперактивації NLRP3 спостерігали суттєве зміщення балансу Th1/Th17 в бік Th17 відповіді [13].

Висновки

Розвиток стресу призводить до значного зниження рівня експресії мРНК Nr3c1 і Adr β 2-рецепторів в імунних клітинах, що, відповідно, нівелює імуносупресивні ефекти ГК. ХСС також супроводжується односпрямованою динамікою зростання транскрипційної активності генів прозапальних цитокінів IL-1 β , IL-17a та Nlrp3-інфламасоми в КАЛТ щурів, більш виразною у випадку ХСС1. Це, в свою чергу, впливає на характер диференціювання лімфоцитів у кишечнику і може бути тригером розвитку запальних та автоімунних захворювань.

Перспективи подальших досліджень

Значний інтерес становить подальше вивчення транскрипційної активності генів-регуляторів імунної відповіді в КАЛТ.

Література. 1.Cole S. Social regulation of human gene expression /S. Cole// Curr. Dir. Psychol. Sci. - 2009. - Vol. 18(3). - P. 132-137. 2.Control of intestinal homeostasis, colitis, and colitis-associated colorectal cancer by the inflammatory caspases /J.Dupaul-Chicoine, G.Yeretssian, K.Doiron [et al.] / Immunity. - 2010. - Vol. 32. - P. 367-78. 3.Chronic exposure to exogenous glucocorticoids primes microglia to pro-inflammatory stimuli and induces NLRP3 mRNA in the hippocampus /M.G. Frank, S.A. Hershman, M.D. Weber [et al.]// Psychoneuroendocrinology. - 2014. - Vol. 40. - P. 191-200. 4.NLRP3 plays a critical role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis by mediating Th1 and Th17 responses /D. Gris, Z. Ye, H.A. Iocca [et al.] // J.Immunol.- 2010. - Vol. 185. - P. 974 -981. 5.Guereschi M.G. Beta2-adrenergic receptor signaling in CD4+ Foxp3+ regulatory T cells enhances their suppressive function in a PKA-dependent manner /M.G.Guereschi, L.P.Araujo, J.T. Maricato // Eur J Immunol. - 2013. - Vol. 43(4). - P. 1001 - 1012. 6. Iudicibus S. Molecular mechanism of glucocorticoid resistance in inflammatory bowel disease /S.Iudicibus, R.Franca, S.Martelossi // World J. // Gastroenterol. - 2011. - Vol. 17(9). - P. 1095-1108. 7.Molecular mechanisms of repeated social defeat-induced glucocorticoid resistance: Role of microRNA /S. Jung, Y. Wang, T. Kim [et al.]// Brain Behav Immun. - 2015. - Vol. 44. - P. 195-206. 8.Kadmiel M. Glucocorticoid receptor signaling in health and disease /M. Kadmiel, J. Cidlowski // Trends Pharmacol. Sci. - 2013. - Vol. 34. - P. 518-530. 9.Kizaki T. Beta2-adrenergic receptor regulates Toll-like receptor-4-induced nuclear factor-kappa B activation through beta-arrestin 2 / T.Kizaki, T. Izawa, T. Sakurai // Immunology. - 2008. - Vol. 124(3). - P. 348 - 356. 10.Manni M. β 2-Adrenergic agonists bias TLR-2 and NOD2 activated dendritic cells towards inducing an IL-17 immuneresponse /M. Manni, R.D. Granstein, G. Maestroni // Cytokine. - 2011. - Vol. 55(3). - P. 380 - 386. 11. Epigenetic Regulation of Beta2-Adrenergic Receptor Expression in TH1 and TH2 Cells /J.W. McAlees, L.T. Smith, R.S. Erbe [et al.] // BrainBehavImmun. 2011. - Vol. 25(3). -P. 408-415. 12.Meijssing S.H. DNA Binding Site Sequence Directs Glucocorticoid Receptor Structure and Activity /S.H. Meijssing, M.A. Pufall, A.Y. So // Science. - 2009. - Vol. 324(5925). - P. 407-410. 13.Meng G. New insights into the nature of autoimmune-inflammatory diseases from mice with Nlrp3 mutations / G.Meng, W.Strober // Eur J Immunol. - 2010. - Vol. 40. - P. 649-53. 14.A mutation in the Nlrp3 gene causing inflammasome hyperactivation potentiates Th17 cell-dominant immune responses / G.Meng, F.Zhang, I.Fuss [et al.]// Immunity. -

2009. - Vol. 30. - P. 860-874. 15. Miller G. Low early-life social class leaves a biological residue manifested by decreased glucocorticoid and increased proinflammatory signaling /G. Miller // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 2009. - Vol. 106(34). - P. 14716-14721. 16. Orlovsky M.A. Allelic polymorphism of glucocorticoid receptor NR3C1 (GR): from molecular biology to clinical implications /M.A. Orlovsky // Biopolymers and Cell. - 2012. - Vol. 28. - P. 338-351. 17. Powell D. Social stress sup-regulates inflammatory gene expression in the leukocyte transcriptome α / β -adrenergic induction of myelopoiesis /D. Powell, K. Sloan, M. Bailey // PNAS. - 2013. - Vol. 3. - P. 1-6. 18. Sanders M. The Beta2-Adrenergic Receptor on T and B Lymphocytes: Do We Underst and It Yet? /M. Sanders // Brain Behav Immun. - 2012. - Vol. 26(2). - P. 195-200.

ИЗМЕНЕНИЯ ТРАНСКРИПЦИОННОЙ АКТИВНОСТИ ГЕНОВ NR3C1 И ADR β 2-РЕЦЕПТОРОВ, ПРОВосПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ И NLRP3-ИНФЛАММАСОМЫ В КИШЕЧНО-АССОЦИИРОВАННОЙ ЛИМФОИДНОЙ ТКАНИ КРЫС В УСЛОВИЯХ ХРОНИЧЕСКОГО СОЦИАЛЬНОГО СТРЕССА

И.А. Топол, А.Н. Камышин

Резюме. В эксперименте исследовалось влияние хронического социального стресса (ХСС) на уровень экспрессии мРНК Nr3c1 и Adr β 2-рецепторов, провоспалительных цитокинов и Nlrp3-инфламмосомы иммунными клетками кишечной-ассоциированной лимфоидной ткани (КАЛТ) у крыс. Выделение тотальной РНК проводили с помощью "Trizol RNA Prep100" (Изоген Lab., LTD, Россия); для проведения обратной транскрипции и получения кДНК использовали набор ОТ-1 "Синтол" (Россия). Для определения уровня экспрессии мРНК генов Nr3c1, Adr β 2, IL-1 β , IL-17a и Nlrp3 проводили ОТ-ПЦР в реальном времени на амплификаторе CFX96™ Real-Time PCR Detection Systems ("Bio-Rad Laboratories, Inc.", США). Относительный уровень экспрессии вышеуказанных генов оценивали по методу $\Delta\Delta$ Ct, нормализуя по референс-гену GAPDH. Установлено, что развитие ХСС приводило к значительному снижению содержания мРНК исследуемых генов Nr3c1 и Adr β 2, а также сопровождалось транскрипционной индукцией генов провоспалительных цитокинов ИЛ-1 β и ИЛ-17a и Nlrp3-инфламмосомы в КАЛТ крыс. Это, в свою очередь, может существенно повлиять на баланс субпопуляций Т-клеток и инициировать развитие воспалительных и аутоиммунных заболеваний.

Ключевые слова: хронический социальный стресс, Nr3c1, Adr β 2, ИЛ-1 β , ИЛ-17a, Nlrp3.

CHANGES IN TRANSCRIPTIONAL ACTIVITY OF GENES NR3C1 AND ADR β 2-RECEPTORS, PRO-INFLAMMATORY CYTOKINES AND NLRP3-INFLAMMASOME IN GUT-ASSOCIATED LYMPHOID TISSUE OF RATS UNDER CHRONIC SOCIAL STRESS

I. A. Topol, A. M. Kamyshny

The aim of research. It is investigated the mRNA expression levels of NR3C1, Adr β 2, pro-inflammatory cytokines IL-1 β , IL-17a and Nlrp3 - inflammasome in gut-associated lymphoid tissue (GALT) under CSS in Wistar rats.

Materials and methods. Researchers have been conducted on 45 rats (female) of Wistar line, which were divided on 3 experimental groups: control rats (group 1); rats, which were modeled CSS1 by means of three weeks social isolation and prolong psychoemotional influence (group 2); rats, which having CSS 2 modeling by means of keeping animals in over populated cages with every day change of grouping (group 3). To determine the level of mRNA NR3C1, Adr β 2, IL-1 β , IL-17a and Nlrp3 expression was performed RT-PCR in real-time by thermocycler CFX96™ Real-Time PCR Detection Systems ("Bio-Rad Laboratories, Inc", USA). Internal standard such as rat reference gene GAPDH were used to normalise mRNA levels between NR3C1 and Adr β 2 for an exact comparison of mRNA transcription level. The relative level of gene expression were studied with mouse reference genes GAPDH by the method $\Delta\Delta$ Ct. Statistical analysis were conducted using available software "Bio-Rad CFX Manager 3.1" (Bio-Rad, USA).

Results. Research of Adr β 2, Nr3c1, IL-1 β , IL-17a and Nlrp3 expression in GALT of ileum showed that the development of CSS led to a significant decrease in mRNA content of Nr3c1 and Adr β 2 genes (Nr3c1 - 3.1 fold (p < 0.05) in CSS1 and 10 fold (p < 0.01) in CSS2; Adr β 2 - 12.5 fold (p < 0.02) in CSS1 and 10.1 fold (p < 0.01) in the case CSS2), while IL-1 β , IL-17a and Nlrp3 expression was a significant increased (IL-1 β (6 fold (p < 0.05) at CSS1 and 2.8 fold (p < 0.05) at CSS2); IL-17A (2.3 fold (p < 0.05) at CSS1 and 50% (p < 0.05) at CSS2; Nlrp3 (17 fold (p < 0.05) at CSS1 and 2.2-fold (p < 0.05) at CSS2) compared with control group of rats.

Conclusion. Thus, the development of chronic social stress was associated with decreased Nr3c1 and Adrb2 expression levels, while IL-1 β , IL-17a, Nlrp3 genes transcriptional activity was increased. This, in turn, can significantly to influence the balance of pro- and anti-inflammatory subsets of T cells and initiate the development of IBD and AID.

Key words: chronic social stress, GALT, Nr3c1, Adrb2, IL-1 β , IL-17a, Nlrp3.

Zaporozhye State Medical University

Clin. and experim. pathol. - 2015. - Vol. 14, №2 (52). - P. 220-225.

Надійшла до редакції 15.06.2015

Рецензент – проф. С.С. Ткачук

© I.O. Topol, O.M. Kamyshny, 2015