

РІВЕНЬ РЕДОКС-ЧУТЛИВИХ ТРАНСКРИПЦІЙНИХ ФАКТОРІВ EGR-1, SP-1 ТА HIF-1 ЗА ЕТАНОЛ-ІНДУКОВАНИХ УРАЖЕНЬ ШЛУНКУ

С. БЕРЕГОВИЙ, Т. ЧЕРВІНСЬКА, Г. ТОЛСТАНОВА

Навчально-науковий центр «Інститут біології» Київського національного університету імені Тараса Шевченка,
e-mail: s_beregoviy@ukr.net

Зміни оксидативного статусу клітин слизової оболонки шлунку є основними чинниками розвитку ерозивно-виразкових ураження в ньому. Egr-1, Sp-1 та Hif-1α – це гіпоксія-чутливі транскрипційні фактори, котрі реагують на гіпоксичні зміни в клітині та приймають участь в патогенезі виразкової хвороби шлунку. Роль гіпоксія чутливих транскрипційних факторів за етанол-індукованих уражень шлунку вивчені недостатньо, тому метою даної роботи була перевірка участі Egr-1, Sp-1 та Hif-1α в патогенезі етанол індукованих уражень шлунку. Дослідження були проведені на білих щурах-самцях вагою 180-220г. Для моделювання етанол-індукованих уражень шлунку, дослідним групам щурів інтрагастрально вводили 1 мл 96% етанолу. Контрольним групам щурів вводили 1 мл фізіологічного розчину. В слизовій оболонці шлунку щурів визначали експресію протеїнів за допомогою Вестерн-блот аналізу. Дія етанолу тривалістю 20 хв викликала масивні крововиливи та ерозії. Збільшення тривалості дії етанолу до 1 год призводило до погіршення клінічної картини. Нами було встановлено зменшення вмісту гіпоксія-чутливого транскрипційного фактору Hif-α через 1 год дії етанолу, що було пов'язано з патологічними змінами в слизовій оболонці шлунку щурів. Вміст транскрипційного фактору Egr-1 залишався не змінним на протязі всього експерименту. Так як Sp-1 конкурує за сайти зв'язування з Egr-1, ми перевірили гіпотезу, що Sp-1 – основний транскрипційний фактор за даної патології. Встановлено, що через 20 хв та 1 год дії етанолу вміст Sp-1 зростає. Отримані результати експресії гіпоксія-чутливих транскрипційних факторів в слизовій оболонці шлунку щурів у відповідь на дію етанолу потребують подальшого дослідження. Зроблено висновок, що за умов розвитку етанол-індукованої виразки шлунку відбуваються різнонаправлені зміни в рівні редокс-чутливих транскрипційних факторів, зокрема Egr -1, Sp -1 та Hif -1. Sp-1 – відіграє ключову роль в патогенезі даної патології.

Ключові слова: виразка шлунку, етанол, гіпоксія, Egr-1, Sp-1, Hif-1α.

Вступ. Зміни оксидативного статусу клітин слизової оболонки шлунку є основними чинниками розвитку ерозивно-виразкових ураження в ньому. Про-оксиданти здатні впливати на транскрипційний апарат клітини, змінюючи активність редокс-чутливих транскрипційних факторів.

Egr-1, Sp-1 та Hif-1α – це гіпоксія-чутливі транскрипційні фактори, котрі реагують на гіпоксичні зміни в клітині. Вони самі, або опосередковано регулюють транскрипцію генів, асоційованих з патогенезом виразкової хвороби шлунку (фактори росту, регулятори клітинного циклу, тощо) (Khomenko et.al., 2006; Szabo et. al., 2007) Egr-1 є ключовим транскрипційним фактором за різноманітних патологій (Rosen et.al. 2005; Thiel and Cibelli, 2002). В попередніх дослідженнях (Береговий та ін.2014) нами встановлено, що експресія Egr-1 підвищувалась на фоні гіпоксії в слизовій оболонці шлунку щурів, котрі були піддані дії водно-іммобілізаційного стресу різної тривалості. Метою даної роботи було дослідження участі редокс-чутливих транскрипційних факторів Egr-1, Sp-1

та Hif-1 в механізмах розвитку етанол-індукованих уражень шлунку щурів.

Матеріали та методи досліджень. Дослідження були проведені на білих щурах-самцях масою 180-220 г які були рандомізовано поділені по 3 щури/група. До початку досліду тварин утримували на голоді 24 години з вільним доступом до води. Впродовж усього експерименту тварини не зазнавали жорстокого поводження і негуманного умиртвіння. Дослідження відповідають основним вимогам щодо утримання та роботи з лабораторними тваринами згідно правил Європейської конвенції щодо захисту хребетних тварин, які використовуються в експериментальних дослідженнях та інших наукових цілях (Страсбург, 1986 р.), та згідно етичних норм у відповідності до українського законодавства.

Для моделювання етанол-індукованих уражень шлунку, дослідним групам щурів інтрагастрально вводили 1 мл 96% етанолу. Контрольним групам щурів вводили 1 мл фізіологічного розчину. Щурів умиртвляли через 20 хв та 1 год. після введення етанолу чи

контрольної субстанції (фізіологічний розчин) шляхом цервікальної дислокації та видаляли шлунок. Шлунок розрізали по малій кривизні, вивертали слизовою назовні, ретельно промивали фізіологічним розчином, реєстрували макроскопічні ураження слизової оболонки шлунку, фотографували та швидко зіскрябували слизову оболонку і занурювали її в рідкий азот для подальших молекулярно-біологічних досліджень.

Для визначення рівня протеїнів методом вестренблот аналізу, видалену слизову оболонку шлунку гомогенізували в лізуючому буфері (0,1% SDS, 1% Triton X100, 2 мкМ PMSF), з додаванням коктейлю інгібіторів протеїназ (16,65 мл/л) та фосфатаз (1 мкМ ортованадат натрія) (Sigma, США). Концентрацію загального протеїну вимірювали за методом Бредфорд з використанням набору «Bio-Rad для білкового аналізу» (Bio-Rad, США). Електрофоретичне розділення протеїнів (50, 75 чи 100 мкг заг. протеїну/зразок) проводили в 12%, 10% чи 8% SDS поліакриламідному гелі, після чого проводили електроперенесення на нітроцелюлозну мембрану згідно стандартного протоколу фірми Bio-Rad. Антитіла до Egr-1 (sc-110, 1:300), Sp-1 (sc-59, 1:500), Hif-1 α (NB100-105, 1:200) β -актин (1:1000) (Santa-Crus Biotech., США) використовували для визначення рівня відповідних протеїнів у слизовій оболонці

шлунка, з наступною інкубацією із вторинними антитілами, кон'югованими з пероксидазою хрому і розведеними у співвідношенні 1:20000 (анти-кролине антитіло), 1:10000 (анти-мишине антитіло). Візуалізацію результатів Вестерн блот проводили ECL-реагентом.

Оптико-денситометричний аналіз проводили за допомогою спеціалізованого програмного забезпечення «Phoretix 1D».

Результати не менше трьох різних експериментів піддавали статистичній обробці за t тестом Стьюдента. Дані представлені у вигляді $M \pm SD$, статистично значущою вважали різницю $p < 0,05$.

Результати та обговорення. Після введення етанолу в слизовій оболонці шлунка щурів ми спостерігали масивні крововиливи, ерозії та виразки. Дані патологічні процеси можуть призводити до гіпоксії в тканинах, тому ми перевірили рівень протеїну Hif-1 α . Нами встановлено, що дія етанолу тривалістю 20 хв не призводила до статистично значущих змін вмісту протеїну Hif-1 α . Але 1 год дії етанолу на слизову оболонку щурів призводила до зменшення вмісту протеїну Hif-1 α в 1.6 разів ($p < 0.05$) (рис. 1). Ці результати можуть свідчити про те, що за умов дії етанолу відбуваються патологічні процеси без залучення Hif-1 α . Дані результати потребують подальшого детального дослідження.

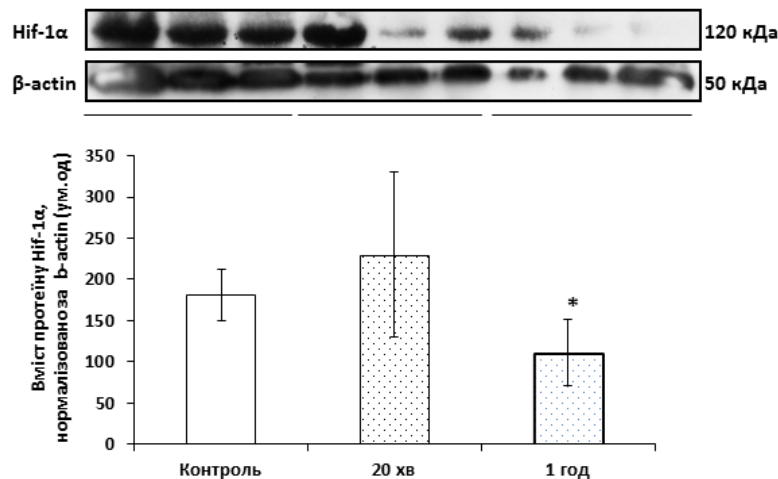


Рис. 1. Вміст протеїну Hif-1 α в слизовій оболонці шлунка щурів за умов етанол-індукованої виразки. Примітка: результати Вестерн блот аналізу нормалізовані за рівнем β -актину, $M \pm SD$, * - $p < 0,05$ відносно показників в контролі.

Fig. 1. Hif-1 protein content in rat gastric mucosa after exposure to ethanol.

Note: Western blot assay results are normalized to β -actin levels, $M \pm SD$, * - $p < 0,05$ in comparison to control values.

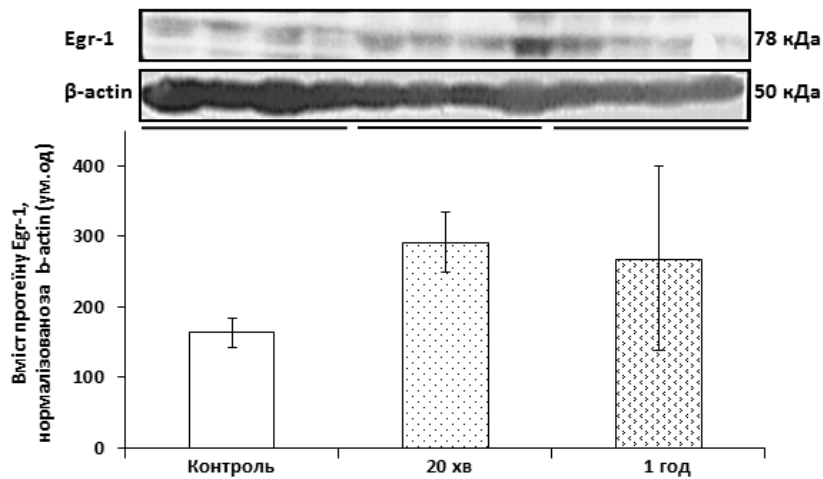


Рис. 2. Вміст протеїну Egr-1 в слизовій оболонці шлунка щурів за умов етанол-індукованої виразки.

Примітка: результати Вестерн блот аналізу нормалізовані за рівнем β -актину, $M \pm SD$, * - $p < 0,05$ відносно показників в контролі.

Fig. 2. Egr-1 protein content in rat gastric mucosa after exposure to ethanol.

Note: Western blot assay results are normalized to β -actin levels, $M \pm SD$, * - $p < 0,05$ in comparison to control values.

За даними літератури (McMullen et.al., 2005) показано, що EGR-1 сприяє підвищенню експресії TNF-альфа, викликаних ліпополісахаридами, після хронічного вживання етанолу щурами та що відсутність EGR-1 запобігає хронічній етанол-індукованій жировій дистрофії печінки. У дослідженнях Szabo та співавт. (Szabo et. al., 2007) показано збільшення експресії протеїну та мРНК Egr-1 за умов цистеамін-викликаній виразки дванадцятипалої кишки. Зниження експресії Egr-1 викликало загострення симптомів хвороби. Група проф. Тарнавського (Tarnawski et.al., 2007) показала, що гіпоксичні зміни в слизовій оболонці шлунка

літніх щурів супроводжувались підвищенням експресії Egr-1 мРНК та протеїну і збільшенням його регуляторної активності. Більш того, літні щури були більш вразливими до розвитку експериментальних виразок шлунка. Нами не виявлено змін вмісту Egr-1 за дії етанолу тривалістю 20 хв та 1 год (рис. 2). Регуляторна активність Egr-1 знаходиться в тісному взаємозв'язку з транскрипційним фактором - Sp1, сайти зв'язування яких частково перекриваються в спільній зоні промотора, що в деяких випадках може призводити до конкуренції за сайт зв'язування (Silverman et. al., 1999; Minc et.al., 1999).

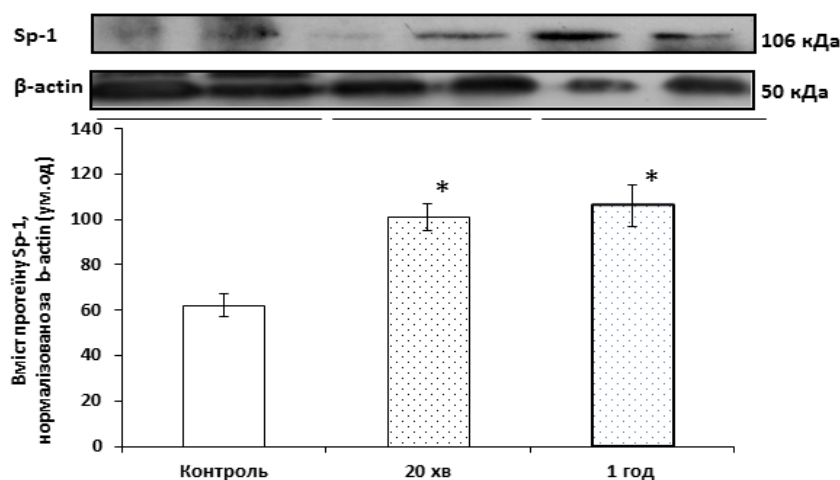


Рис. 3. Вміст протеїну Sp-1 в слизовій оболонці шлунка щурів за умов етанол-індукованої виразки

Примітка: результати Вестерн блот аналізу нормалізовані за рівнем β -актину, $M \pm SD$, * - $p < 0,05$ відносно показників в контролі.

Fig. 3. Sp-1 protein content in rat gastric mucosa after exposure to ethanol.

Note: Western blot assay results are normalized to β -actin levels, $M \pm SD$, * - $p < 0,05$ in comparison to control values.

Тому на фоні відсутньої експресії Egr-1 ми припустили, що за етанол-індукованих уражень шлунка щурів ключовим транскрипційним фактором може бути Sp-1. Нами встановлено зростання транскрипційної активності Sp-1 в 1.6 разів ($p < 0,05$) через 20 хв дії етанолу на слизову оболонку щурів. Через 1 годину дії етанолу на слизову оболонку щурів вміст транскрипційного фактору Sp-1 досягав свого максимуму та був вище в 1,7 разів ($p < 0,05$) від контрольних показників (рис. 3). Це свідчить про залучення Sp-1 в патологічні процеси за умов етанол-індукованих виразок шлунка щурів.

Це може свідчити про те, що молекулярні механізми в слизовій оболонці шлунка щурів у відповідь на дію етанолу є інакшими порівняно з дією стресу, про що свідчить залучення Sp-1 а не Egr-1 та зниження експресії Hif-1 α . Отримані результати експресії гіпоксія-чутливих транскрипційних факторів в слизовій оболонці шлунка щурів у відповідь на дію етанолу потребують подальшого дослідження.

Висновки. Нами вперше встановлено, що за умов розвитку етанол-індукованої виразки шлунку відбуваються різнонаправлені зміни в рівні редокс-чутливих транскрипційних факторів Egr -1, Sp -1 та Hif -1. Показано, що Sp-1 – відіграє ключову роль в патогенезі даної патології.

Список літератури:

1. Береговий С. Механізм розвитку стрес індукованих уражень шлунка: роль гіпоксії та транскрипційного фактору EGR-1 / С. Береговий, О.

Єфименко, Я. Олефір, Г. Толстанова // The Ukrainian Biochemical Journal. – 2014. – Vol. 86, № 5. – С. 42.

2. Suppression of early growth response factor-1 with egr-1 antisense oligodeoxynucleotide a ggravates experimental duodenalul cers / T. Khomenko, S. Szabo, X. Deng [et al.] // Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol. – 2006. - Vol. 290, №. 6. – P. 1211–1218.

3. Early growth response-1 transcription factor is essential for ethanol-induced fatty liver injury in mice / M. R. McMullen, M. T. Pritchard, Q. Wang [et al.] // Gastroenterology. – 2005. – Vol. 128, № 7. – P. 2066–2076.

4. The human copper-zinc superoxide dismutase gene (SOD1) proximal promoter is regulated by Sp1, Egr-1, and WT1 via non-canonical binding sites / E. Minc, P. de Coppet, P. Masson [et al.] // J. Biol. Chem. – 1999. – Vol. 274, №1. – P. 503-509.

5. Rosen J. B. Expression of egr-1 (zif268) mRNA in insect fear-related brain regions following exposure to a predator / J. B. Rosen, R. E. Adamec, B. L. Thompson // Behav. Brain Res. – 2005. – Vol. 162, №. 2. – P. 279–288.

6. Silverman E. S. Pathways of Egr-1-mediated gene transcription in vascular biology / E. S. Silverman, T. Collins // Am. J. Pathol. – 1999. – Vol. 154, № 3. – P. 665-670.

7. New molecular mechanism of duodenalul ceration / S. Szabo, X. Deng, T. Khomenko [et al.] // Ann. N. Y. Acad. Sci. – 2007. – Vol. 1113. – P. 238-255.

8. Aging gastropathy-novel mechanisms: hypoxia, up-regulation of multifunctional phosphatase PTEN, and proapoptotic factors / A. Tarnawski, R. Pai, X. Deng [et al.] // Gastroenterology. – 2007. – Vol. 133, № 6. – P. 1938-1947.

9. Thieland G. Regulation of life and death by the zinc finger transcription factor Egr-1 / G. Thieland G. Cibelli // J. Cell. Physiol. – 2002. – Vol. 193, №. 3. – P. 287–292.

THE LEVEL OF REDOX-RESPONSIVE TRANSCRIPTION FACTOR EGR-1, SP-1 AND HIF-1 UNDER CONDITIONS OF ETHANOL-INDUCED GASTRIC LESIONS

Beregovyi S., Chervinska T., Tolstanova G.

Changes in redox status of gastric mucosa cells are the main pathogenic factor of gastric erosion and gastric ulcer development. Egr-1, Sp-1 and Hif-1 α – are the hypoxia-sensitive transcription factors that respond to hypoxic changes in cells and are involved in the pathogenesis of gastric ulcer. The role of hypoxia-sensitive transcription factors during ethanol-induced gastric lesions studied not enough, so the aim of this study was to test the involvement Egr-1, Sp-1 and Hif-1 α in the pathogenesis of ethanol-induced gastric lesions. The investigations were conducted on white male rats with weight of 180-220 g. For modeling of ethanol-induced gastric lesions, experimental groups of rats were injected intragastrically 1 ml of 96% ethanol. Control groups of rats were administered 1 ml of saline. In the gastric mucosa of rats was determined protein expression by Western blot analysis. 20 minutes of ethanol exposure caused the massive hemorrhages and erosions. Increased exposure time was associated with worsened clinical picture. We have established decrease in the content of hypoxia-sensitive transcription factor Hif- α after 1 hour ethanol exposure, that was associated with pathological changes in gastric mucosa of rats. The content of transcription factor Egr-1 remained unchanged during the entire experiment. Since Sp-1 competes for binding sites with Egr-1, we tested the hypothesis that Sp-1 - main transcription factor for this pathology. We found that 20 minutes and 1 hour of ethanol exposure induced increasing of Sp-1 content. The results of expression of hypoxia-sensitive transcription factors in rats gastric mucosa in response to ethanol requires further studying. We concluded that under the conditions of ethanol-induced gastric ulcers there are multidirectional changes in the level of redox-sensitive transcription factors, including Egr -1, Sp -1 and Hif -1. Sp-1 - plays a key role in the pathogenesis of this disease.

Key words: gastric ulcer, ethanol, hypoxia, Egr-1, Sp-1, Hif-1 α .

Одержано редколегією 11.05.2015