БЕРЕГОВИЙ СЕРГІЙ МИХАЙЛОВИЧ. Назва дисертаційної роботи: "РОЛЬ ТРАНСКРИПЦІЙНОГО ФАКТОРУ EGR-1 В ПАТОГЕНЕЗІ ВИРАЗКОВОЇ ХВОРОБИ ШЛУНКА"

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТЕ

ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

На правах рукопису

БЕРЕГОВИЙ СЕРГІЙ МИХАЙЛОВИЧ

УДК 577.12:612.35:612.34:616.33-008.821.14

РОЛЬ ТРАНСКРИПЦІЙНОГО ФАКТОРУ EGR-1 В ПАТОГЕНЕЗІ

ВИРАЗКОВОЇ ХВОРОБИ ШЛУНКА

03.00.04 – біохімія

дисертація на здобуття наукового ступеня

кандидата біологічних наук

Науковий керівник:

доктор біологічних наук, доцент кафедри біохімії

Толстанова Ганна Миколаївна

Київ – 2015 р.

2

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ....................................................................7

ВСТУП......................................................................................................................8

РОЗДІЛ 1................................................................................................................13

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ..........................................................................................13

1. Egr-1 - протеїн ранньої відповіді.....................................................................13

1.1. Egr-1 - структура та локалізація……………………………………....13

1.2. Роль Egr-1 в регуляції процесів життєдіяльності організму………..14

1.3. Роль мітоген-активованих протеїнкіназ (MAP-кіназ) в

запуску транскрипції Egr-1, VEGF, bFGF………………………………...18

1.4. Egr-1 у стрес реакціях організму……………………………………..19

1.5. Роль Egr-1 в механізмах виразкоутворення шлунка та

дванадцятипалої кишки………………………………..…………………..22

РОЗДІЛ 2................................................................................................................29

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ......................................................29

2.1. Реактиви та матеріали……………………………………….......................29

2.2. Моделювання стрес-викликаних уражень шлунка методом

імобілізації в модифікації Гройсмана та Каревіної («соціальний

стрес»)……………………………................................................................30

2.3. Моделювання стрес-викликаних уражень шлунка методом водноімобілізаційного стрессу..............................................................................31

3

2.4. Моделювання уражень шлунка методом інтрагастрального

введення етанолу...........................................................................................31

2.5. Моделювання уражень шлунка методом інтрагастрального

введення аспірину.........................................................................................32

2.6. Вплив блокатора Erk-1/2 MAP-кіназ на ураження слизової оболонки

шлунка, викликані водно-імобілізаційним стресом...................................32

2.7. Дослідження впливу Син та Анти ізомерів похідних 2-(2-

амінотіазол-4-ил)-2-метоксиіміноацетат Na на швидкість гоєння стрес

індукованих виразок шлунка щурів.............................................................33

2.8. Гістологічні дослідження..................................................................... 34

2.9. Імуногістохімічна детекція рівня гіпоксії в слизовій оболонці

шлунка............................................................................................................35

2.10. Виділення слизової оболонки шлунка щура та приготування

тотального екстракту....................................................................................37

2.11. Визначення загальної концентрації протеїнів в тотальному

екстракті клітин слизової оболонки шлунка щурів за методом

Бредфорда......................................................................................................37

2.12. Визначення вмісту тіолових груп......................................................38

2.13. Визначення вмісту дієнових кон’югатів та шиффових основ........39

2.14. Визначення вмісту ТБК-активних сполук........................................39

2.15. Визначення рівня кортизолу хемілюмінесцентним методом.........40

2.16. Дослідженя змін вмісту протеїнів методом

Вестерн-блот аналізу....................................................................................40

2.17. ПЛР зі зворотньою транскрипцією...................................................43

2.18. Статистична обробка данних............................................................44

РОЗДІЛ 3...............................................................................................................45

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ .................................45

3. Залучення транскрипційного фактору egr-1 в патогенез виразкової хвороби

шлунка щурів........................................................................................................45

4

3.1. Роль Egr-1 в патогенезі стрес-індукованої виразки шлунка

щурів.....................................................................................................................45

3.1.1. Макроскопічні зміни в слизовій оболонці шлунка щурів після дії

водно-імобілізаційного стресу різної тривалості.............................................45

3.1.2. Рівень Egr-1 в слизовій оболонці шлунка щурів підданих дії

імобілізаційного водно-імерсійного стресу......................................................46

3.1.3. Рівень Egr-1 в слизовій оболонці шлунка щурів підданих дії

«соціального» стресу...........................................................................................48

3.2. Роль Egr-1 в розвитку виразкових уражень слизової оболонки

шлунка, викликаних аспірином.........................................................................50

3.2.1. Макроскопічні зміни в слизовій оболонці шлунка щурів в різні

терміни після введення аспірину.......................................................................51

3.2.2. Рівень Egr-1 в слизовій оболонці шлунка щурів в різні терміни

після введення аспірину......................................................................................52

3.3. Роль Egr-1 в розвитку виразкових уражень слизової оболонки

шлунка, викликаних етанолом...........................................................................53

3.3.1. Макроскопічні зміни слизової оболонці шлунка щурів після

дії етанолу різної тривалості..............................................................................54

3.3.2. Рівень Egr-1 в слизовій оболонці шлунка щурів підданих дії

етанолу різної тривалості....................................................................................55

3.4. Рівень Sp-1 в слизовій оболонці шлунка щурів за умов

експериментального виразкоутворення............................................................57

3.5. Рівень про-ангіогенних факторів в слизовій оболонці шлунка щурів за дії

ульцерогенних чинників.....................................................................................60

3.5.1. Рівень VEGF в слизової оболонки шлунку щурів за дії різних

ульцерогенних чинників.....................................................................................61

3.5.2. Рівень bFGF в слизовій оболонці шлунка щурів за дії різних

ульцерогенних чинників.....................................................................................64

РОЗДІЛ 4..............................................................................................................70

5

4. Дослідження механізмів залучення Egr-1 в патогенез експериментального

виразкоуттворення.................................................................................................70

4.1. Концентрація кортизолу в сироватці крові щурів за умов стресу різної

тривалості...............................................................................................................70

4.2. Роль гіпоксії та прооксидантних змін в слизовій оболонці шлунка щурів в

механізмах активації Egr-1 в патогенезі експериментального

виразкоутворення..................................................................................................72

4.2.1. Рівень гіпоксія індуцибельного фактора HIF -1α та розвиток гіпоксії в

слизовій оболонці шлунка щурів за дії ульцерогенних

чинників..................................................................................................................72

4.2.2. Вміст продуктів перекисного окиснення ліпідів в слизовій оболонці

шлунка щурів за дії водно-імобілізаційного стресу...........................................76

4.2.3. Вміст тіолових груп в слизовій оболонці шлунка щурів за умов дії

водно-імобілізаційного стресу різної

тривалості...............................................................................................................78

4.3. Залучення Erk1/2 та p38 MAP-кіназних шляхів в патогенез виразкової

хвороби шлунка різного генезу............................................................................79

4.3.1. Залучення Erk1/2 та p38 MAP-кіназних шляхів в патогенез виразки

шлунка щурів викликаної водно-імобілізаційним

стресом....................................................................................................................79

4.3.2. Залучення Erk-1/2 MAP-кіназного шляху в патогенез аспіринвикликаної виразки шлунка щурів.......................................................................82

4.3.3. Залученння Erk1/2 MAP-кіназного шляху в патогенез етанолвикликаної виразки шлунка щурів......................................................................83

4.4. Вплив блокатора Erk-1/2 MAP кіназ на розвиток уражень в слизовій

оболонці шлунка щурів, викликаних водно-імобілізаційним

стресом...................................................................................................................84

РОЗДІЛ 5................................................................................................................92

6

5. Вплив похідних 2-(2-амінотіазол-4-ил)-2-метоксиіміноацетат na (син та

анти ізомери) на швидкість гоєння стрес викликаної виразки шлунка

щурів.......................................................................................................................92

5.1. Макроскопічні зміни в слизовій оболонці шлунка щурів після дії Син- та

Анти ізомерів.........................................................................................................92

5.2. Рівень Egr-1 в слизовій оболонці шлунка щурів після дії Син- та Антиізомерів...................................................................................................................95

5.3. Рівень ангіогенних факторів VEGF та bFGF в слизовій оболонці шлунка

щурів після дії Син- та Анти-ізомерів.................................................................96

АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ...................................................99

ВИСНОВКИ.........................................................................................................124

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ.....................................................................................126

7

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

Анти- ізомер похідного 2-(2-амінотіазол-4-ил)-2-метоксиіміноацетату Na

ДПК – дванадцятипала кишка

ІЛ – інтерлейкін

НПЗП – нестероїдні протизапальні препарати

O‾2 – супероксидний аніон-радикал

Син – ізомер похідне 2-(2-амінотіазол-4-ил)-2-метоксиіміноацетату Na

ТБК – тіобарбітурова кислота

ABC – авідин–біотин–пероксидаза комплекс

Egr-1 (Early growth response-1) – білок «ранньої відповіді»

Erk – позаклітинна сигнал-регулюєма кіназа

HIF – гіпоксія-індуцибельний фактор

НРА – гіпоталамо–гіпофізарно–адреналова вісь

H. pylori – Helicobacter pylori

PNMT – фенілетаноламін-N-метилтрансфераза

ROS – реактивні форми кисню

SH-групи– тіолові групи

SRF – serum response factor

SRE – serum response elements

TCF – ternary complex factors

8

ВСТУП

Актуальність теми. Не дивлячись на успіхи сучасної фармакології в

лікуванні виразкової хвороби, захворюваність на виразку шлунка та

дванадцятипалої кишки не зменшується а навіть збільшується. Серед

основних етіологічних чинників розвитку виразкової хвороби шлунка

виділяють психологічний стрес, прийом нестероїдних протизапальних

препаратів (НПЗП), тощо. Стрес став невід’ємною частиною життя сучасного

суспільства. Крім того, постійно зростає кількість пацієнтів з хронічними

запальними захворюваннями, що є показанням до тривалого прийому НПЗП.

Це обумовлює актуальність дослідження механізмів патогенезу виразкової

хвороби та розробки нових механізмів її лікування.

Egr-1 (Early growth response-1) – редокс-чутливий транскрипційний фактор

(також відомий як Krox-24, NGFI-A, zif268) - білок «ранньої відповіді», так

як стимули різного походження, включаючи гіпоксію, фактори росту,

інтерлейкіни, гормони та нейромедіатори, сильно та швидко спричиняють

експресію його гену. Ген Egr-1 був відкритий як фактор що стимулює ріст

фібробластів у відповідь на компоненти сироватки крові; він локалізований

на хромосомі 5q23-q31 і складається з двох екзонів [1]. Аналіз

функціональних елементів геному людини (проект ENCODE) [2] виявив Egr1 зв’язуючи сайти в промоторних регіонах факторів росту (EGF, PDGF-A, -B;

VEGF) та рецепторів до них (PDGFR-A, -B) [3], які є критичними в

механізмах розвитку й гоєння виразок шлунка не лише шляхом регуляції

ангіогенезу, а також через попередження клітинної смерті різного типу [4]. В

дослідженнях на мезенхімальних стовбурових клітинах показано, що Egr-1

відіграє роль транскрипційного фактору, який конвергує багаточисельні

сигнальні шляхи, обумовлюючи регенеративний потенціал даного типу

клітин [3].

В попередніх дослідженнях було встановлено, що Egr-1 є ключовим

транскрипційним фактором в патогенезі експериментальної виразки

9

дванадцятипалої кишки [5]. Дані щодо ролі Egr-1 в патогенезі виразкової

хвороби шлунку обмежені. Показано, що зниження рН [6] чи інкубування з

патогенним штамом H. pylori (cag+) [7] викликає підвищення Egr-1 мРНК та

протеїну і його зв’язування з ДНК в культурі епітеліальних клітин шлунку. В

порівняльних дослідженнях на молодих та літніх щурах, встановлено, що

гіпоксичні зміни в слизовій оболонці шлунка (СОШ) літніх щурів

супроводжувались підвищенням експресії та регуляторної активності Egr-1,

це асоціювалось з більшою вразливістю до розвитку етанол-викликаної

виразки шлунка [8]. Роль Egr-1 в механізмах НПЗП- та стрес-зумовлених

виразок шлунка не досліджувалась. Також, залишається відкритим питання

чи є Egr-1 універсальним транскрипційним фактором патогенезу виразкової

хвороби та які механізми його активації за даної патології.

Наведений вище стан проблеми став основою для формулювання мети та

завдань наших досліджень.

Зв’язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

Дисертаційна робота виконана в рамках науково-дослідної роботи

Навчально-наукового центру «Інститут біології» Київського національного

університету імені Тараса Шевченка "Механізми реалізації адаптаційнокомпенсаторних реакцій організму за умов розвитку різних патологій" (№ д/р

0111U004648, 2011-2015 рр.).

Мета і завдання дослідження. Метою роботи було дослідити механізми

активації та роль редокс-чутливого транскрипційного фактору Egr-1 в

патогенезі виразкової хвороби шлунка різного генезу.

Відповідно до мети було поставлено наступні завдання:

1. Дослідити динаміку змін експресії редокс-чутливих

транскрипційних факторів Egr-1 та Sp-1 в залежності від етіологічного

чинника та стадії розвитку експериментальної виразки шлунка.

2. Дослідити динаміку змін рівня про-ангіогенних факторів VEGF

та bFGF в залежності від етіологічного чинника та стадії розвитку

експериментальної виразки шлунка.

10

3. Визначити роль гормону стресу та гіпоксії в механізмах активації

Egr-1 при стрес-викликаній виразці шлунка.

4. З’ясувати участь Erk-1/2 та p-38 MAP-кіназ в механізмах

розвитку експериментальної виразки шлунка та їх роль в активації Egr-1 при

стрес-викликаній виразці шлунка.

5. Дослідити вплив новосинтезованих син- та анти-ізомерів

похідної 2-гідроксиімінооцтової кислоти на процеси гоєння виразок шлунка

та з’ясувати залучення Egr-1 до механізму їх дії.

Об’єкт дослідження: Механізми біохімічних порушень в клітинах СОШ

за умов експериментальної виразки шлунка.

Предмет дослідження: Білки слизової оболонки шлунка щурів.

Методи дослідження. У роботі використовували біохімічні,

спектрофотометричні, молекулярні, гістологічні, імуногістохімічні,

фармакологічні методи та методи варіаційної статистики.

Наукова новизна роботи. Отримані результати суттєво розширюють

сучасні уявлення щодо біохімічних механізмів патогенезу виразкової

хвороби шлунка та дозволяють доповнити їх новою концепцією залучення

редокс-чутливого транскрипційного фактору до запуску гастропротективних

механізмів. Встановлено ключову роль редокс-чутливого транскрипційного

фактору Egr-1 у патогенезі стрес- та НПЗП-індукованих уражень шлунка.

Показано, що редокс-чутливий транскрипційний фактор Egr-1 не бере участі

в патогенезі етанол-викликаних уражень шлунка щурів.

Згідно запропонованої концепції, Egr-1 активується гіпоксією та

підвищенням рівня гормонів стресу, зокрема кортизолу, що запускають

Erk1/2- MAP-кіназний шлях. Блокада Erk1/2- MAP-кіназного шляху

пригнічує експресію Egr-1 і, таким чином, попереджає запуск Egr-1-залежних

гастропротекторних механізмів.

Практичне значення одержаних результатів. Одержані результати

поглиблюють розуміння біохімічних механізмів патогенезу виразкової

хвороби шлунка та підкреслюють необхідність індивідуального підходу до

11

лікування даної патології в залежності від етіологічного чинника, що її

викликає.

Крім того, в роботі досліджена ангіогенотропна активність

новосинтезованих син- та анти-ізомерів похідної 2-гідроксиімінооцтової

кислоти. Встановлена їх здатність знижувати рівень про-ангіогенних

факторів VEGF, bFGF, що свідчить про перспективність їх використання для

пригнічення надмірного ангіогенезу, який спостерігається при злоякісному

рості чи хронічних запальних захворюваннях.

Особистий внесок здобувача. Інформаційний пошук, проведення

експерименту та аналіз результатів дослідження виконані дисертантом

особисто. Формування ідеї роботи, планування та розробка методичних

підходів до виконання комплексу лабораторних досліджень, узагальнення

отриманих результатів проведено за участю наукового керівника. Допомогу в

проведені досліджень змін рівня протеїнів Egr-1, VEGF, bFGF надавала

м.н.с., к.б.н. Червінська Т.М. Допомогу в проведені досліджень експресії

мРНК Egr-1 надавала н.с., к.б.н. Драніцина О.С. Допомогу в проведенні

досліджень щодо процесів ліпопероксидації в СОШ щурів надавала д.б.н.,

с.н.с. Дворщенко К.О.

Особлива подяка професору Каліфорнійського університету м. Ірвайн

(США) Ш. Сабо за ідею досліджень та допомогу з реактивами.

Апробація результатів дисертації. Основні результати дисертаційної

роботи доповідалися та обговорювалися на: V міжнародній конференції

студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології» (Львів, 2009), Х

Українському біохімічному з’їзді (Одеса, 2010), XV міжнародному

медичному конгресі студентів та молодих вчених (Тернопіль, 2011), 6-му

Міжнародному симпозіумі «Cell/Tissue Injury and

Cytoprotection/Organoprotection» (Санкт-Петербург, Росія, 2011), 19th United

European Gastroenterology Week (Стокгольм, Швеція, 2011), 4-й міжнародній

науковій конференції “Advances in Pharmacology and Pathology of the

Digestive Tract” (Київ, 2012), на підсумковій науково-практичній конференції

12

Всеукраїнського конкурсу студентських наукових робіт за галуззю

«Біологічні науки» (Запоріжжя, 2013), Experimental Biology-2013 (Бостон,

США, 2013), XI Українському біохімічному конгресі (Київ, 2014), II

Міжнародному медико-фармацевтичному конгресі студентів і молодих

вчених (Чернівці, 2015).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 16 наукових робіт,

що відображають основний зміст дисертаційної роботи: 6 статей у фахових

періодичних наукових виданнях, з яких 2 публікації, включені до

міжнародних наукометричних баз, 10 тез у матеріалах міжнародних та

всеукраїнських конгресів, конференцій, з’їздів.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота складається із

вступу, огляду літератури, матеріалів і методів дослідження, результатів

роботи та їх обговорення, заключення, висновків, списку літератури, що

включає 190 джерел. Дисертація викладена на 148 стор., містить 39 рисунків

та 1 таблицю.



































































