

Експресія генів *REG1A*, *GAST* та *TGFB1* за умов розвитку та загоєння стресіндукованих уражень слизової оболонки шлунка щурів

А.С. Драницина, О.О. Моргаєнко, Д.М. Гребіник, Л.І. Остапченко

Навчально-науковий центр "Інститут біології" Київського національного університету
ім. Тараса Шевченка; e-mail: alevtina.dranitsina@gmail.com

У роботі досліджено експресію гена *Reg1a* у слизовій оболонці шлунка щурів за умов розвитку та загоєння стресіндукованих уражень. Підвищення було зафіксовано після 1 - годинної дії пошкоджувального чинника – у 2,1 раза, а максимальний рівень відзначали після 3 год стресового впливу – у 3,5 раза, при цьому вказані зміни відбувалися на фоні інтенсифікації процесів пероксидації ліпідів та порушення функціонування антиоксидантної системи. Через 12 та 24 год після припинення дії стресора різко знижувався рівень експресії гена *Reg1a*: в 1,6 та 2 рази відповідно. Аналіз експресії гена *Gast* не підтвердив, що саме гастрин є одним із головних стимуляторів експресії *Reg1a* в слизовій шлунка за умов водно-імерсійного стресу. У динаміці розвитку та загоєння стрес-індукованих уражень виявлено позитивну кореляцію між експресією генів *Reg1a* та *Tgfb1*, що може свідчити про залучення гена *Tgfb1* до прискорення загоєння уражень.

Ключові слова: стрес; виразкові ураження слизової оболонки шлунка; загоєння; експресія генів; *Reg1a*; *Gast*; *Tgfb1*.

ВСТУП

Серед поширених проблем сучасної гастроентерології провідне місце посідають патології шлунково-кишкового тракту, при цьому особлива увага приділяється виразковим ураженням шлунка і дванадцятипалої кишки (ДПК).

Незважаючи на численні дослідження, біохімічні аспекти формування і загоєння виразкових уражень остаточно нез'ясовані і потребують нових підходів і глибшого вивчення. Виявлення збудника *Helicobacter pylori* дало змогу певною мірою розкрити причини виникнення виразкових уражень, однак залишилося нез'ясованим питання, як відбувається ульцерогенез за відсутності цього мікроорганізму [1, 2]. Поширеними факторами виразкоутворення є нервово-психічні чинники, адже перенапруження нервової системи та стреси – невід'ємні риси життя людини у сучасному суспільстві.

© А.С. Драницина, О.О. Моргаєнко, Д.М. Гребіник, Л.І. Остапченко

Відомо, що формування виразкових уражень слизової оболонки шлунка (СОШ) і ДПК пов'язано з розвитком запалення, зміщенням рівноваги у про- та антиоксидантній системі. Окисний стрес, що при цьому виникає, супроводжується порушенням молекулярних механізмів регуляторних процесів у клітині й призводить до зміни експресії окремих генів [1, 3].

Ген *Reg1a* кодує однойменний регенеративний білок (regenerating islet-derived protein 1a or a lectin-related protein). Він забезпечує формування ендокринних островців і регенерацію підшлункової залози в патологічних умовах, а також залучений до диференціації її клітин за умов регенерації [4-6]. На експериментальних моделях було показано, що продукт зазначеного гена є потенційним фактором росту, має трофічний вплив на клітини СОШ і відіграє важливу роль при регенерації ушкоджень шлунка. Зокрема, він є необхід-

ним для загоювання виразок у непухлинному епітелії шлунка [5, 7-9]. Рівень експресії гена *Reg1a* підвищувався під час загоювання гострих уражень СОШ щурів, спричинених як водно-імерсійним стресом, так і введенням індометацину [10].

Ген *Reg1a* переважно експресується у фундальних ентерохромафіноподібних (ЕХП) клітинах СОШ [7, 10]. Гастрин (кодується геном *Gast*) є важливим фактором росту ЕХП-клітин, адже він регулює експресію генів хромограніну А (необхідний для процесингу пропептиду гістаміну), везикулярного моноамінного транспортера 2, гістидиндекарбоксілази внаслідок зв'язування з гастриновим рецептором у цих клітинах [9]. Також було зазначено, що саме гастрин є одним із стимуляторів експресії гена *Reg1a* в СОШ, зокрема при гіпергастринемії, яка виникає саме після водно-імерсійного стресу та в інфікованих *Helicobacter pylori*.

Крім того, було показано, що експресія гена *Reg1a* в ацинарних клітинах ПЗ та під час пошкодження і загосення СОШ за рахунок різних чинників регулюється цитокінами: трансформуючим фактором росту α (TGF- α), епідермальним фактором росту (EGF), інтерлейкінами (ІЛ) 6, 8, інтерферонами, цитокініндукованим нейтрофільним хемоатрактантом CINC-2 β (мишачий гомолог – ІЛ 8), трефоліновими факторами (TFFs) тощо [5, 6, 10, 11].

Цитокін TGF- β 1 (ізоформа 1 TGF- β , кодується геном *Tgfb1*) є потужним онкосупресором у нормальних клітинах, спричиняє множинні впливи на різні їх типи, беручи участь у регуляції росту, їх диференціації, апоптозі, регенерації при пошкодженні та в імунній відповіді внаслідок активації дозрівання Т-регуляторних клітин із подальшим інгібуванням запалення [12-14].

Метою нашої роботи було визначити експресію генів *Reg1a*, *Gast* та *Tgfb1* за умов розвитку та загосення стресіндукованих уражень СОШ щурів.

МЕТОДИКА

У роботі дотримувалися міжнародних рекомендацій стосовно проведення медико-біологічних досліджень із використанням тварин відповідно до Європейської конвенції (Страсбург, 1986).

Досліди проводили на самцях нелінійних білих щурів масою 250 – 270 г. Тварин утримували на стандартному раціоні віварію. За добу до проведення експерименту вони мали доступ лише до води. Нейродистрофічні ураження шлунка викликали за допомогою іммобілізаційного водно-імерсійного стресу, для цього щурів поміщали в металеві перфоровані патрони з прозорим вікном у верхній частині для голови. Патрони занурювали у вертикальному положенні в резервуар так, щоб 2/3 тіла тварини перебувало під водою (23°C) [15]. Щурів забивали методом дислокації шийних хребців через 0,5, 1, 2, 3 год стресового впливу, а також через 12 та 24 год після його припинення. Тварин у кожній експериментальній групі було 7. Визначали вміст малонового діальдегіду за реакцією з тіобарбітуровою кислотою (ТБК) [16], каталазну активність за здатністю пероксиду водню утворювати з солями молібдену стійкий забарвлений комплекс [17], а також концентрацію білка за методом Лоурі [18].

РНК отримували за методом Chomczynski та Sacchi [19]. Зворотнотранскрипційну полімеразну ланцюгову реакцію (ЗТ-ПЛР) проводили в 20 мкл реакційної суміші, яка містила 2 мкг РНК, 1 ммоль/л дезоксинуклеозидтрифосфатів (дНТФ), 200 од. зворотної транскриптази «Thermo Scientific RevertAid Reverse Transcriptase», відповідний буферний розчин, 20 од. рибонуклеазного інгібітора «Thermo Scientific RiboLock RNase Inhibitor» («Thermo Scientific», Литва), 1 мкмоль/л зворотного праймера. Синтез відбувався при 65°C – 5 хв, 42°C – 60 хв. ПЛР проводили в 30 мкл реакційної суміші, що містила 3 мкл кДНК, буферний розчин, по 200 мкмоль/л кожного дНТФ («Thermo Scientific», Литва),

по 1 мкмоль/л кожного праймера, до 2,5 ммоль/л $MgCl_2$ та 1 од. ДНК полімерази «Taq DNA Polymerase (recombinant)» («Thermo Scientific», Литва). Ампліфікацію фрагментів ДНК здійснювали за таких температурних умов: ініціююча денатурація $95^{\circ}C$ – 3 хв; далі 35 циклів (для *Actb* - β -актин - ген, що використовується як внутрішній контроль реакції завдяки конститутивній експресії – 28 циклів): денатурація ДНК $95^{\circ}C$ – 45 с; гібридизація праймерів $48^{\circ}C$ – 45 с для *Reg1a* (608 п.н.), $52^{\circ}C$ – 40 с для *Gast* (310 п.н.), $52^{\circ}C$ – 45 с для *Tgfb1* (298 п.н.) та $49^{\circ}C$ – 40 с для *Actb* (521 п.н.); добування ланцюга $72^{\circ}C$ – 1 хв 15 с (для *Reg1a* та *Tgfb1*) або 1 хв (для *Gast* та *Actb*). Після цього проводили елонгацію ампліфікатів при $72^{\circ}C$ – 5 хв.

У реакціях було використано послідовності праймерів: для *Reg1a* – прямий – AGCCTGCAGAGATTGTTGAC і зворотний – CCATAGGGCAGTGAGGCAAG; для *Gast* – прямий – GCCCAGCCTCTCATCATC і зворотний – GGGGACAGGGCTGAAGTG; для *Tgfb1* – прямий – CTTGAGCTCCACAGAGAAGA ACTGC і зворотний – CACGATCATGTTG GACAAGTGTCTCC; для *Actb* – прямий – TGGGACGATATGGAGAAGAT і зворотний – ATTGCCGATAGTGATGACCT. Відтворюваність результатів ампліфікації була перевірена в паралельних експериментах повторенням ПЛР на кДНК усіх тварин, із кожним праймером, не менше ніж 3 рази.

Розділення продуктів ПЛР проводили електрофоретично в 1,6 %-му агарозному гелі («Agarose LE», «Roche», Німеччина), у 0,5-кратному тріс-боратному буферному розчині (TBE), при напруженні 5-10 В/см [20]. Для напівкількісного аналізу експресії ампліконів на основі денситометрії було використано програму ImageJ 1.45s (НИН, США). Індeksi експресії мРНК визначали для кожного зразка [21].

Математичну та статистичну обробку результатів досліджень проводили на комп'ютері з використанням програмного пакета GraphPad Prism 5.04 (GraphPad Soft-

ware Inc., США). Їх перевіряли на нормальне розподілення за допомогою тесту Шапіро-Уїлка. Подальший обрахунок відбувався за допомогою односпрямованого дисперсійного аналізу (one-way ANOVA) із пост-тестом Тукі. Отримані результати наведені у вигляді середнього арифметичного \pm середньоквадратичне відхилення (дисперсія) – SD. Оцінку сили взаємозв'язку окремих показників визначали за допомогою коефіцієнта лінійної кореляції Пірсона (r). Кореляцію вважали сильною при $r > 0,5$; помірною – від 0,3 до 0,5; слабкою – від 0,1 до 0,3 [22]. Значення розглядали як вірогідні при $P \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

За умов експериментального стресіндукованого виразкоутворення відбувалась інтенсифікація процесів пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) у клітинах СОШ: вміст ТБК-активних сполук істотно перевищував контрольні значення після 1 год впливу (в 1,9 раза), зростав протягом усього періоду дії стресора і сягав максимум на 3-тю годину: в 2,8 раза порівняно з контрольною групою тварин ($P \leq 0,001$). Незважаючи на те, що загоювання СОШ супроводжувалося зниженням вмісту вторинних продуктів ПОЛ, їх значення лишалися підвищеними щодо контролю: в 1,9 і 1,7 раза відповідно ($P \leq 0,001$). Виявлене вірогідне підвищення каталазної активності в СОШ за умов виникнення (в 1,3, 1,4 і 1,6 раза за 1, 2 і 3 год дії чинника відповідно) та загоєння (у 2 і 2,2 раза через 12 і 24 год після припинення дії відповідно, $P \leq 0,001$) стресіндукованих уражень шлунка вказують на суттєві порушення функціонування антиоксидантної системи в організмі. Отже, зміни вищезазначених біохімічних показників характеризують стан організму і дають змогу встановити передумови як порушень у СОШ за умов стресіндукованих уражень, так і процесу загоєння. Важливо було охарактеризувати рівні експресії генів *Reg1a*, *Gast* та *Tgfb1* у разі виразкового патогенезу

та загоєння, оскільки вільні радикали прямо чи опосередковано впливають на них.

Дослідження характеру експресії гена *Reg1a* показало, що рівень його мРНК в контрольній групі становив $0,044 \pm 0,0064$ ум. од. відносно *Actb*. При дії пошкоджувального чинника було виявлено вірогідне підвищення експресії цього гена в 2,1 та 2,8 раза (1 і 2 год відповідно), максимальне значення було зафіксовано через 3 год після впливу (збільшення в 3,5 раза) порівняно з контрольною групою тварин ($P \leq 0,001$, див. рис. 1.). Під час регенерації ушкоджених ділянок СОШ рівень мРНК гена *Reg1a* різко знижувався: в 1,6 та 2 рази через 12 і 24 год відповідно ($P \leq 0,001$) порівняно з показниками в тварин, що піддавалися 3 - годинній дії стресора, проте залишалися підвищеними порівняно з контролем в 2,2 та 1,8 раза відповідно ($P \leq 0,001$; див. рис. 1.).

Ген *Reg1a* відіграє важливу роль при загоюванні виразок у непухлинному епітелії шлунка [5, 7-9]. Рівень його експресії зростає при гострих і хронічних запальних процесах [4, 9, 10], однак починає повертатися до контрольних значень при зниженні інтенсивності патологічного процесу [5, 6, 9, 10]. Таким чином, антиапоптотичні та пропроліферативні властивості цього гена при регенерації слизової шлунка повинні чітко регулюватися, наприклад, інгібуванням сигнальних шляхів STAT3 та Akt/Bad/Bcl-xL для запобігання пухлинній трансформації епітеліальних клітин шлунка [5, 6].

У нашому дослідженні показано зростання рівня мРНК *Reg1a* за умов розвитку нейродистрофічних уражень шлунка щурів. Отримані результати підтверджуються даними літератури, де показано, що при іммо-

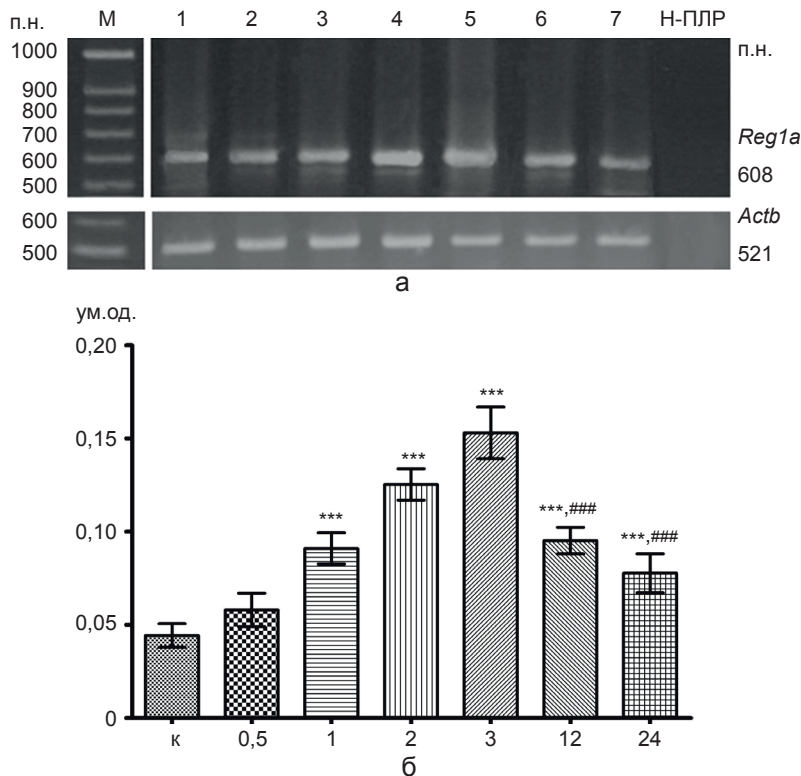


Рис. 1. Рівень експресії мРНК гена *Reg1a* за умов розвитку та загоєння стресіндукованих уражень слизової оболонки шлунка: а – електрофореграма розділення продуктів зворотнотранскрипційної полімеразної ланцюгової реакції, б – гістограма відносного рівня експресії, М – маркер молекулярної маси; 1 – контроль; 2 – 5 днів стресу впродовж 0,5; 1; 2 і 3 год відповідно; 6, 7 – 12 і 24 год після припинення дії стресора відповідно; *** $P \leq 0,001$ порівняно з контролем; ### $P \leq 0,001$ порівняно з групою тварин, що піддавалися 3-годинній дії стресора

білізаційному водно-імерсійному стресі в СОШ щурів зростає як кількість клітин, які експресують цей ген, так і власне рівень експресії *Regla*, особливо в ділянках виразкового ураження [7, 9]. Після припинення дії стресора зменшувався ступінь ураження СОШ, що супроводжувалося різким зниженням рівня експресії гена *Regla*. Наші результати підтверджують важливу роль *Regla* під час загоювання гострих уражень СОШ щурів, спричинених водно-імерсійним стресом, як і у разі виразкоутворення, індукованого введенням оцтової кислоти чи індометацину [9, 10]. Деякі автори відмічають [8-10], що саме гастрин опосередковує експресію *Regla* в ЕХП-клітинах слизової шлунка, що, у свою чергу, може свідчити про ключову роль гена *Gast* в її активації за умов розвитку та загоєння стресіндукованих уражень СОШ.

Нами було виявлено, що в зразках СОШ

контрольної групи щурів рівень експресії гена *Gast* становив - $0,051 \pm 0,0054$ ум. од. відносно *Actb*, а за умов розвитку стресіндукованих уражень - підвищення в 2,8 раза через 0,5 год впливу ($P \leq 0,001$). Надалі при розвитку стресу, як і при загоюванні уражень, було зафіксовано поступове зниження цього показника з поверненням до контрольних значень, починаючи з 3-ї години (див. рис. 2.).

Отже, рівень експресії зазначеного гена тимчасово зростає на початку впливу пошкоджувального фактора й поступово наближався до свого базального рівня на 3-й годині іммобілізаційного водно-імерсійного стресу. Також у нашому дослідженні не було виявлено кореляційного взаємозв'язку рівнів експресії генів *Regla* та *Gast* ($r = -0,2$, $P = 0,70$).

Хоча *Regla* переважно експресується в ЕХП-клітинах, які мають рецептор до гастрину, нами, як і в інших працях (зокрема

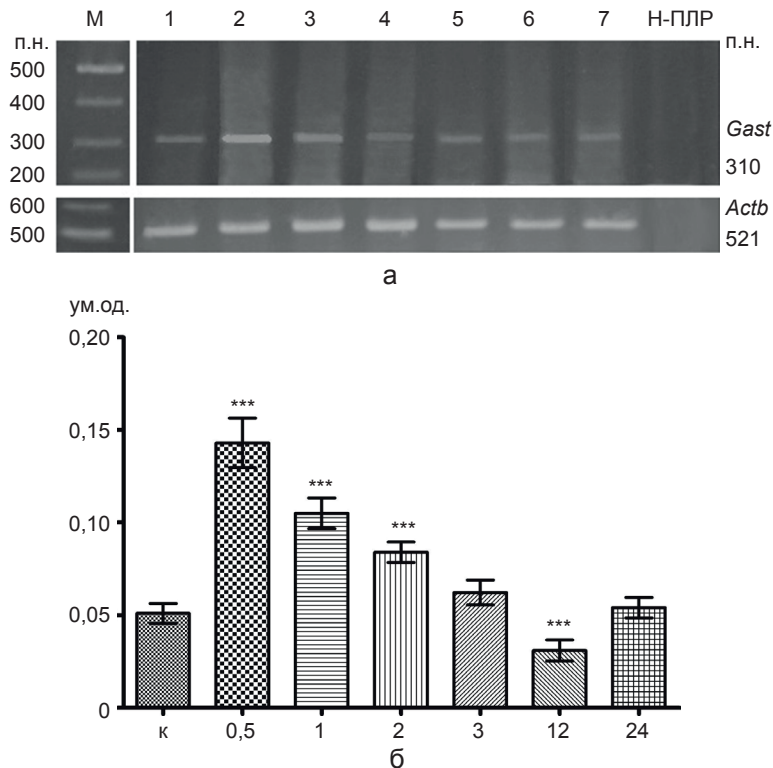


Рис. 2. Рівень експресії мРНК гена *Gast* за умов розвитку та загоєння стрес-індукованих уражень слизової оболонки шлунка: а – електрофореграма розділення продуктів зворотнотранскрипційної полімеразної ланцюгової реакції, б – гістограма відносного рівня експресії, М – маркер молекулярної маси; 1 – контроль; 2 – 5 днів стресу впродовж 0,5; 1; 2 і 3 год відповідно; 6, 7 – 12 і 24 год після припинення дії стресора відповідно; *** $P \leq 0,001$ порівняно з контролем

при аналізі вмісту гастрину в сироватці крові та використанні селективних антагоністів гастринового рецептора), не було показано суттєвого впливу гастрину на рівень експресії цього гена при розвитку та загосенні стресіндукованих уражень СОШ [9, 10]. Таким чином, одержані нами результати також не підтверджують, що саме гастрин є одним із головних стимуляторів експресії *Reg1a* за умов водно-імерсійного стресу.

Відомо, що підвищення рівня як експресії гена *Reg1a*, так і синтезу *Reg1a* не завжди є наслідком впливу пошкоджувальних агентів у шлунку або асоційовані з розвитком різних патологічних станів, зокрема канцерогенезом [10]. Через це здається ймовірним участь інших стимуляторів експресії *Reg1a* в слизовій шлунка, потрібних або для активації загосення уражень, або для загострення патологічних процесів [10, 13]. Зокрема на рівень експресії гена *Reg1a* під час пошкодження та загосення

СОШ впливають різні цитокіни [5, 6, 10, 23].

Дослідження характеру експресії гена *Tgfb1* показало, що рівень його мРНК в контрольній групі становив $0,068 \pm 0,0067$ ум. од. відносно *Actb*. Нами було виявлено достовірне підвищення експресії *Tgfb1* при збільшенні тривалості впливу стресового фактора: в 2,1 та майже 3 рази (1 і 3 год відповідно) порівняно з контролем ($P \leq 0,001$). Максимальне значення було зафіксовано вже через 2 год (збільшення в 3,4 раза; $P \leq 0,001$). Під час регенерації нейродистрофічних уражень СОШ рівень мРНК гена *Tgfb1* різко знижувався та сягав контрольних значень через 12 год після припинення дії стресора (див. рис. 3.).

Різними авторами показано зростання експресії генів, що кодують наступні цитокіни: CINC-2 β (ген *Cxcl3*), IL-1b, IL-6, TNF-a, EGF, HGF (фактор росту гепатоцитів, ген *Hgf*) тощо за умов іммобілізаційного водно-імер-

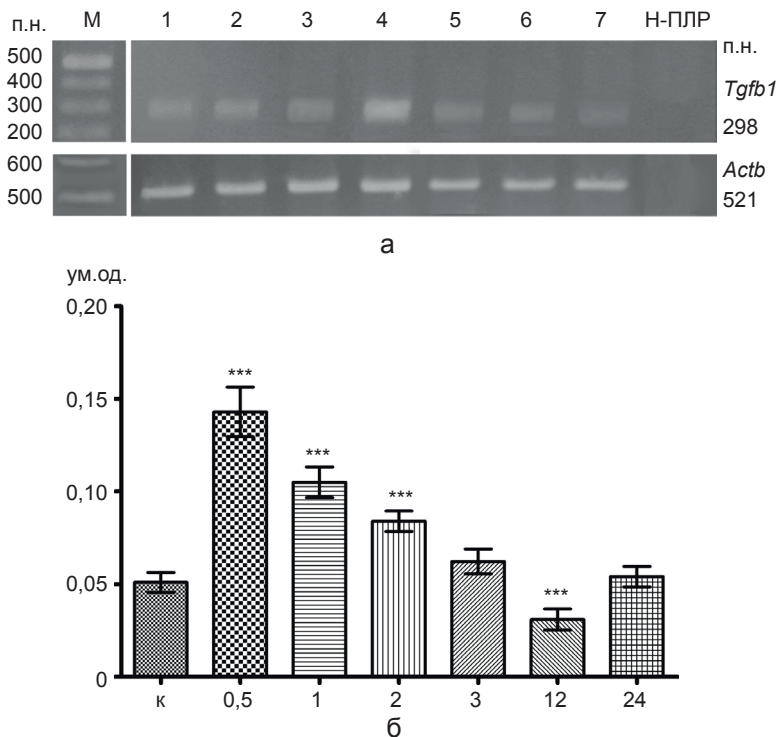


Рис. 3. Рівень експресії мРНК гена *Tgfb1* за умов розвитку та загосення стрес-індукованих уражень слизової оболонки шлунка: а – електрофореграма розділення продуктів зворотнотранскрипційної полімеразної ланцюгової реакції, б – гістограма відносного рівня експресії, М – маркер молекулярної маси; 1 – контроль; 2 – 5 днів стресу впродовж 0,5; 1; 2 і 3 год відповідно; 6, 7 – 12 і 24 год після припинення дії стресора відповідно; *** $P \leq 0,001$, ** $P \leq 0,01$ порівняно з контролем

сійного стресу [5, 6, 9, 23]. Зокрема при інкубації ЕХП-клітин із зазначеними цитокинами виявлено їх різну здатність до стимуляції експресії *Regla* [9, 10]. Окрім того, інгібування їх дії за допомогою нейтралізуючих антитіл призводило до гальмування процесу загоювання виразок у шлунку [9, 10, 23].

У нашому дослідженні зростання рівня експресії *Tgfb1* передувало збільшенню експресії гена *Regla* за умов іммобілізаційного водно-імерсійного стресу. Отримані нами результати можна зіставити з даними літератури, де продемонстровано підвищення експресії *Cxcl3*, яке передувало збільшенню рівня експресії *Regla* за стресових умов [9, 10].

Як видно з рис. 4, у проведеному нами дослідженні було виявлено сильну позитивну кореляцію між експресією генів *Regla* та *Tgfb1* ($r = 0,8$, $P = 0,038$) у динаміці розвитку та загоєння стресіндукованих уражень шлунка. Виходячи з одержаних результатів, ми припускаємо, що підвищення експресії гена *Tgfb1* за умов розвитку стресіндукованих уражень СОШ може додатково стимулювати зростання рівня експресії *Regla* та прискорювати загоювання виразкових уражень внаслідок регулювання клітинного поділу й диференціації та інгібування запалення [9,

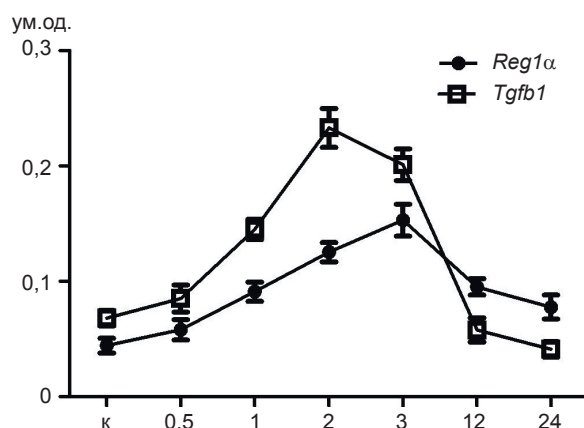


Рис. 4. Кореляційні зв'язки між експресією генів *Regla* та *Tgfb1* за умов розвитку та загоєння стресіндукованих уражень слизової оболонки шлунка: 1 – контроль; 2 – 5 дії стресу впродовж 0,5; 1; 2 і 3 год відповідно; 6, 7 – 12 і 24 год після припинення дії стресора відповідно

10]. Отримані нами результати узгоджуються з даними, де було показано збільшення синтезу в слизовій шлунка TGF- β , рецепторів до нього (TGF- β receptor II, TGF- β receptor I (ALK5)) і експресії відповідних генів за умов розвитку уражень СОШ [12, 14, 23]. Хоча ген *Tgfb1*, з одного боку, є потужним онкосупресором у нормальних клітинах, а з іншого – онкопротомором у малігнізованих клітинах [13]. А розвиток пухлин часто асоційований із втратою чутливості до гальмівного ефекту TGF- β_1 або із надмірною експресією цього фактора. Нещодавно було продемонстровано, що зменшення активних форм TGF- β_1 призводить до посилення запалення, подальшого продукування медіаторів запалення, зростання експресії гена *Hgf*, а також посилення проліферації епітеліальних клітин аденокарциноми шлунка [13].

Звичайно на процес загоювання стресіндукованих уражень СОШ та стимулювання експресії *Regla* можуть впливати різні трофічні фактори і TGF- β_1 лише один із них [10, 13]. Проте ми робимо припущення про можливий вплив цитокіна TGF- β_1 (на відміну від гастрину) на зростання рівня експресії *Regla* та його додатковий внесок у загоювання деструктивних уражень СОШ за умов стресу. Проте остаточне підтвердження або спростування цього припущення потребує проведення подальших досліджень із застосуванням селективних антагоністів гастринного рецептора та аналізу прямого впливу цитокіна TGF- β_1 на експресію гена *Regla* в культурі ЕХП-клітин.

Таким чином, нами показано, що за умов розвитку стресіндукованих уражень СОШ щурів на фоні інтенсифікації процесів пероксидації ліпідів і зміни каталазної активності зростає експресія гена *Regla*, у той час як після припинення дії стресора спостерігається її зменшення. Аналіз експресії гена *Gast* за тих самих умов не підтвердив, що саме гастрин є одним з головних стимуляторів експресії гена *Regla* в слизовій шлунка. У динаміці розвитку та загоєння стресіндукованих

уражень шлунка виявлено позитивну кореляцію між експресією генів *Reg1a* та *Tgfb1*, що може свідчити про залучення останнього до прискорення загоєння уражень.

**А.С. Драницина, А.А. Моргаєнко,
Д.Н. Гребиньк, Л.І. Остапченко**

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ *REG1A*, *GAST* И *TGFB1* В УСЛОВИЯХ РАЗВИТИЯ И ЗАЖИВЛЕНИЯ СТРЕСС-ИНДУЦИРОВАННЫХ ПОВРЕЖДЕНИЙ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ЖЕЛУДКА КРЫС

В работе исследовано экспрессию гена *Reg1a* в слизистой оболочке желудка крыс в условиях развития и заживления стрессиндуцированных повреждений. Повышение было зафиксировано после 1-часового воздействия повреждающего фактора – в 2,1 раза, а максимальный уровень экспрессии отмечали после 3 ч стрессового воздействия – в 3,5 раза, при этом указанные изменения происходили на фоне интенсификации процессов ПОЛ и нарушения функционирования антиоксидантной системы. Через 12 и 24 ч после прекращения действия стрессора наблюдалось резкое снижение уровня экспрессии гена *Reg1a*: в 1,6 и 2 раза соответственно. Анализ экспрессии гена *Gast* не подтвердил, что именно гастрин является одним из главных стимуляторов экспрессии *Reg1a* в слизистой желудка в условиях водно-иммерсионного стресса. В динамике развития и заживления стресс-индуцированных поражений желудка выявлена положительная корреляция между экспрессией генов *Reg1a* и *Tgfb1*, что может свидетельствовать о вовлечении гена *Tgfb1* к ускорению заживления повреждений.

Ключевые слова: стресс; язвенные повреждения желудка; заживление; экспрессия генов; *Reg1a*; *Gast*; *Tgfb1*.

**A.S. Dranitsina, O.O. Morgaienko, D.M. Grebinyk
L.I. Ostapchenko**

EXPRESSION OF *REG1A*, *GAST* AND *TGFB1* GENES IN CONDITIONS OF STRESS-INDUCED GASTRIC MUCOUS LESIONS DEVELOPMENT AND HEALING IN RATS

Analysis of *Reg1a* gene expression in rat gastric mucosa under development and healing of stress-induced lesions was carried out. Increased expression of *Reg1a* was observed after 1 hour of stressor impact - 2,1 times, and achieved the maximum level expression after 3 hours of stress exposure - 3,5 times, that occurred on the background of lipid peroxidation intensification and antioxidant system dysfunction. The sharp decrease in 1,6 and 2 times of *Reg1a* gene expression was shown in 12 and 24 hours respectively after termination of the stressor action. Analysis of *Gast* gene expression did not confirm that gastrin stimulated *Reg1a* expression in gastric

mucosa under water immersion restraint stress. The positive correlation between *Reg1a* and *Tgfb1* genes expression was determined in the dynamics of stress-induced gastric lesions' development and healing, which may indicate the involvement of *Tgfb1* to acceleration of lesion's healing.

Key words: stress-induced lesions; gastric mucosa; healing; gene expression; *Reg1a*; *Gast*; *Tgfb1*.

*Educational and Scientific Center «Institute of Biology»,
Taras Shevchenko National University of Kyiv*

REFERENCES

1. Singh LP, Mishra A, Saha D, Swarnakar S. Doxycycline blocks gastric ulcer by regulating matrix metalloproteinase-2 activity and oxidative stress. *World J Gastroenterol*. 2011; 17(28):3310-21.
2. Yeomans ND. The ulcer sleuths: The search for the cause of peptic ulcers. *Gastroenterol. Hepatol*. 2011; 26(1):35-41.
3. Dvorshchenko KO, Bernyk OO, Dranitsina AS, Senin SA, Ostapchenko LI. Influence of oxidative stress on the level of genes expression TGFB1 and HGF in rat liver upon long-term gastric hypochlorhydria and administration of multiprobiotic Symbiter. *Ukr Biochem J*. 2013; 85(5):114-23. [Ukrainian].
4. Peterson KM, Xiaoti Guo, Elkahoul AG., Mondal D., Bardhan PK., Sugawara A, Duggal P, Haque R, Petri Jr. WA. The expression of REG 1A and REG 1B is increased during acute amebic colitis. *Parasitol Int*. 2011; 60(3):296-300.
5. Sekikawa A, Fukui H, Fujii S, Nanakin A, Kanda N, Uenoyama Y, Sawabu T, Hisatsune H, Kusaka T, Ueno S, Nakase H, Seno H, Fujimori T, Chiba T. Possible role of REG 1a protein in ulcerative colitis and colitic cancer. *Gut*. 2005; 54:1437-44.
6. Sekikawa A, Fukui H, Fujii S, Ichikawa K, Tomita S, Imura J, Chiba T, Fujimori T. REG 1a protein mediates an anti-apoptotic effect of STAT3 signaling in gastric cancer cells. *Carcinogenesis*. 2008; 29(1):76-83.
7. Asahara M, Mushiaki S, Shimada S, Fukui H, Kinoshita Y, Kawanami C, Watanabe T, Tanaka S, Ichikawa A, Uchiyama Y, Narushima Y, Takasawa S, Okamoto H, Tohyama M, Chiba T. *Reg* gene expression is increased in rat gastric enterochromaffin-like cells following water immersion stress. *Gastroenterology*. 1996; 111:45-55.
8. Fukui H, Franceschi F, Penland RL, Sakai T, Sepulveda AR, Fujimori T, Terano A, Chiba T, Genta RM. Effects of *Helicobacter pylori* infection on the link between regenerating gene expression and serum gastrin levels in Mongolian gerbils. *Lab Invest*. 2003; 83(12):1777-86.
9. Kazumori H, Ishihara S, Hoshino E, Kawashima K, Nobuyuki M, Suetsugu H, Sato H, Adachi K, Fukuda R, Watanabe M, Takasawa S, Okamoto H, Fukui H, Chiba T, Kinoshita Y. Neutrophil chemoattractant 2b regulates expression of the *Reg* gene in injured gastric mucosa in rats. *Gastroenterology*. 2000; 119:1610-22.
10. Yoshino N, Ishihara S, Rumi MAK, Ortega-Cava CF, Yuki

- T, Kazumori H, Takazawa S, Okamoto H, Kadowaki Y, Kinoshita Y. Interleukin-8 regulates expression of Reg protein in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosa. *American Journal of Gastroenterology*. 2005; 100:2157–66.
11. Ernst H, Konturek P, Hahn EG, Brzozowski T, Konturek SJ. Acceleration of wound healing in gastric ulcers by local injection of neutralising antibody to transforming growth factor β 1. *Gut*. 1996; 39:172–5.
12. Kim Seok-Hyung, Lee Seung-Hyun, Choi Yoon-La, Wang Li-Hui, Park CK, Shin YK. Extensive alteration in the expression profiles of TGFB pathway signaling components and TP53 is observed along the gastric dysplasia-carcinoma sequence. *Histol Histopathol*. 2008; 23:1439–52.
13. Ota M, Horiguchi M, Fang V, Shibahara K, Kadota K, Loomis C, Cammer M, Rifkin DB. Genetic suppression of inflammation blocks the tumor-promoting effects of TGF- β in gastric tissue. *Cancer research*. 2014; 74(9):1–9.
14. Shih Shou-Chuan, Tseng Kwang-Wen, Lin Shee-Chan, Kao Chin-Roa, Chou Sun-Yen, Wang Horng-Yuan, Chang Wen-Hsiung, Chu Cheng-Hsin, Wang Tsang-En, Chien Chung-Liang. Expression patterns of transforming growth factor-beta and its receptors in gastric mucosa of patients with refractory gastric ulcer. *World J Gastroenterol*. 2005; 11(1):136–41.
15. Takagi K, Okabe S. The effects of drugs on the production and recovery processes of the stress ulcer. *Jpn. J Pharmacol*. 1968; 18:9–18.
16. Stalnaya ID, Garishvili TG Method for determination of malondialdehyde using thiobarbituric acid. *Modern methods in biochemistry. Medicine*. 1977; 66–68. [Russian].
17. Koroliuk M, Ivanova L, Mayorova I, Tokarev V. Method of katalase activity determination. *Lab delo*. 1988; 1:16–9. [Russian].
18. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RI. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951; 193(1):265–75.
19. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987; 162(1):156–9.
20. Green MR, Sambrook J, editors. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 4th ed., New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2012.
21. Konturek PC., Brzozowski T, Pierzchalski P, Kwiecien S, Pajdo R, Hahn EG, Konturek SJ. Activation of genes for spasmolytic peptide, transforming growth factor alpha and for cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2 during gastric adaptation to aspirin damage in rats. *Aliment Pharmacol Ther*. 1998; 12:767–77.
22. Cohen J, editor. *Statistical power analysis for the behavioral sciences*. 2nd ed., Routledge; 1988.
23. Milani S, Calabrò A. Role of growth factors and their receptors in gastric ulcer healing. *Microscopy Research and Technique*. 2001; 53(5):360–71.

*Матеріал надійшов
до редакції 13.08.2015*