

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ПАТОГЕНЕЗА КАРРАГИНАН-ИНДУЦИРОВАННОГО ГАСТРОЭНТЕРОКОЛИТА

ТКАЧЕНКО А.С.¹, ЖУКОВ В.И.¹, ГУБИНА-ВАКУЛИК Г.И.¹, НАКОНЕЧНАЯ О.А.¹,
ГОРБАЧ Т.В.¹, ОНИЩЕНКО А.И.¹, ТКАЧЕНКО М.А.²

¹Харьковский национальный медицинский университет, г. Харьков, Украина

²Харьковская городская клиническая больница № 27, г. Харьков, Украина

Вестник ВГМУ. – 2018. – Том 17, №4. – С. 37-47.

EXPERIMENTAL STUDY OF CARRAGEENAN-INDUCED GASTROENTEROCOLITIS PATHOGENESIS

TKACHENKO A.S.¹, ZHUKOV V.I.¹, GUBINA-VAKULYCK G.I.¹, NAKONECHNA O.A.¹, GORBACH T.V.¹,
ONISHCHENKO A.I.¹, TKACHENKO M.A.²

¹Kharkov National Medical University, Kharkov, Ukraine

²Kharkov Municipal Clinical Hospital No. 27, Kharkov, Ukraine

Vestnik VGMU. 2018;17(4):37-47.

Резюме.

Целью работы явился анализ возможных механизмов развития каррагинан-индуцированного гастроэнтероколита у лабораторных животных в условиях экспериментальной модели.

Материал и методы. У половозрелых крыс-самок, употреблявших каррагинан перорально в течение двух и четырех недель, в сыворотке крови определяли уровни ТБК-активных продуктов и диеновых конъюгатов, карбонилированных белков, общую антиоксидантную активность, активность каталазы и супероксиддисмутазы, содержание цитокинов, содержание каспазы-3, матричной металлопротеиназы-2, фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) и sFASL, а в гомогенате тонкого кишечника – активность поли(АДФ-рибоза) полимеразы, протеинкиназы-1, регулирующей апоптотический сигнал, индуцибельной и эндотелиальной NO-синтазы, уровень фрагментации ДНК, а также концентрацию эндотелина-1. Оценивали белковый спектр сыворотки крови. Проводили морфологическое и иммуногистохимическое исследование препаратов тонкого кишечника с использованием антител к антигену Ki-67.

Результаты. Установлено, что употребление каррагинана приводит к развитию гастроэнтероколита. Заболевание сопровождается развитием оксидативного стресса, активацией апоптоза энтероцитов с компенсаторной недостаточной активацией их пролиферации, нарушениями со стороны цитокинового спектра сыворотки крови, увеличением проницаемости эпителиального барьера тонкого кишечника, эндотелиальной дисфункцией сосудов тонкого кишечника и явлениями неоангиогенеза.

Заключение. Пусковыми звеньями развития каррагинан-индуцированного гастроэнтероколита являются, по всей видимости, нарушения редокс-гомеостаза, возникающие под действием каррагинана, и активный синтез провоспалительных цитокинов.

Ключевые слова: пищевые добавки, каррагинан, каррагинан-индуцированное воспаление, патогенез, гастроэнтероколит.

Abstract.

Objectives. To analyze possible mechanisms for the development of experimental carrageenan-induced gastroenterocolitis in laboratory animals.

Material and methods. Adult female rats were administered carrageenan during 2 and 4 weeks orally. Blood serum levels of TBA-reactive substances and diene conjugates, carbonylated proteins, total antioxidant status, catalase and superoxide dismutase activity, the content of cytokines, caspase-3, matrix metalloproteinase-2, vascular endothelial growth factor (VEGF) and sFASL were determined. The activity of poly (ADP-ribose) polymerase, apoptosis signal-regulating protein

kinase-1 (ASK-1), inducible and endothelial NO-synthases, levels of DNA fragmentation, endothelin-1 were measured in the small intestine homogenate. The blood serum protein spectrum was assessed. Morphological and immunohistochemical studies of the small intestine were carried out using antibodies to the Ki-67 antigen.

Results. It has been found that the consumption of carrageenan results in the development of gastroenterocolitis. The disease is accompanied by the development of oxidative stress, activation of enterocyte apoptosis with compensatory inadequate activation of enterocyte proliferation, abnormal serum cytokine spectrum, increased permeability of the small intestinal epithelial barrier, endothelial dysfunction of the small intestinal vessels, and neoangiogenesis.

Conclusions. The impairment of redox homeostasis occurring under the action of carrageenan and overproduction of proinflammatory cytokines by leukocytes are believed to be triggers for the development of carrageenan-induced gastroenterocolitis.

Key words: food additives, carrageenan, carrageenan-induced inflammation, pathogenesis, gastroenterocolitis.

Каррагинаны представляют собой водорастворимые биополимеры-полисахариды, экстрагированные из различных видов красных морских водорослей, которые характеризуются способностью образовывать гели [1]. Данное свойство каррагинанов позволило им найти свое применение в пищевой промышленности, где каррагинаны используются в качестве загустителей и эмульгаторов. Данные биополимеры зарегистрированы в качестве пищевой добавки и классифицированы под номером E407. Они обладают статусом безопасной пищевой добавки в США.

В то же время вопрос безопасности каррагинанов остается открытым. Многочисленные эксперименты демонстрируют, что каррагинан является индуктором острых и хронических воспалительных процессов [2-4]. Однако детальные механизмы инициации воспалительного процесса каррагинаном и особенности течения каррагинан-индуцированного воспаления в желудочно-кишечном тракте не изучены.

Целью работы явился анализ возможных механизмов развития и течения каррагинан-индуцированного гастроэнтероколита (ГЭК) у лабораторных животных в условиях экспериментальной модели.

Материал и методы

Экспериментальное исследование проводилось на половозрелых крысах-самках популяции WAG, которые были разделены на три группы в случайном порядке. Первая группа включала животных, которые принимали 1% раствор пищевой добавки лямбда-каррагинан в течение 2 недель ежедневно перорально (n=10). Вторая группа состояла из крыс, которые употребляли такой же раствор каррагинана в течение 4

недель (n=10). Контрольная группа состояла из интактных здоровых животных, содержащихся в неизменных стандартных условиях вивария (n=10). Раствор каррагинана готовился за сутки до использования и хранился в холодильнике при температуре +2°C. Животных выводили из эксперимента путем декапитации под тиопенталовым наркозом (60 мг/кг внутривенно).

После выведения из эксперимента у животных выделялся тонкий кишечник. Его фрагменты фиксировались в 10%-ном нейтральном формалине, осуществлялась спиртовая проводка и парафиновая заливка. Затем формировали пятимикрометровые срезы, которые окрашивали гематоксилин-эозином, галлоцианин-хромовыми квасцами по Ейнарсону, пикрофуксином по Ван Гизону, ставили ШИК-реакцию [5].

Для оценки пролиферативной активности эпителиоцитов тонкого кишечника использовалась иммуногистохимическая реакция с применением антител к ядерному антигену Ki-67 производства фирмы «Dako» (Дания). Полученные комплексы антиген-антитело визуализировали после обработки ФИТЦ-мечеными антителами фирмы «Dako» (Дания) [6].

Для микроскопирования и фотографирования препаратов тонкого кишечника использовали микроскопы «Axiostar-plus» (Zeiss) и «Axioscope 40» (Zeiss) (световое и люминесцентное микроскопирование).

Для проведения биохимических исследований тонкий кишечник перфузировали охлажденным физиологическим раствором. Кишечник, замороженный в жидком азоте, измельчали до порошкообразного состояния. Гомогенат готовили в 0,25 М трис-HCl, который содержал 0,32 М сахарозы. При центрифугировании полученного гомогената выделяли супернатант, который использовали для исследования.

Активность протеинкиназы-1, регулирующей апоптотический сигнал, (ASK-1) в гомогенате кишечника определяли по методу, описанному Сумбаевым В.В. Фрагментацию ДНК определяли спектрофотометрически по методу Галитовского В.Е. с соавторами [7]. Активность поли (АДФ-рибоза) полимеразы (ПАРП) определяли с помощью метода, который основан на электрофоретическом отделении поли-АДФ-рибозилированных гистонов из ядер с последующим количественным определением в них поли-АДФ-рибозы.

Концентрацию ТБК-активных продуктов в сыворотке крови определяли спектрофотометрическим методом по Федоровой Т.К. и соавт. [8], а диеновых конъюгатов - по Гаврилову Б.В. и соавт. [9]. Общую антиоксидантную активность (ОАА) сыворотки крови определяли спектрофотометрически [10]. Для определения продуктов окислительной модификации белков (ОМБ) в сыворотке крови использовали метод, описанный Дубининой Е.Е. и соавт. [11]. Содержание белка в сыворотке крови определяли по методу Лоури.

НО-синтазную активность в гомогенатах тонкого кишечника определяли спектрофотометрически [12]. Для изучения содержания вазоконстрикторного белка эндотелина-1 в гомогенате тонкого кишечника животных использовали наборы для иммуноферментного анализа компании «Amersham» (Великобритания). Концентрации фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), а также цитокинов моноцитарного хемоаттрактантного белка-1 (MCP-1), ФНО- α , интерлейкина-1 α (ИЛ-1 α) и интерлейкина-4 (ИЛ-4) в сыворотке крови определяли иммуноферментным методом в соответствии с инструкциями фирм-производителей.

Содержание протеолитического апоптоз-ассоциированного фермента каспазы-3 в сыворотке крови лабораторных животных определяли ИФА-методом набором фирмы «eBioscience» (Вена, Австрия). Концентрацию матриксной металлопротеиназы-2 (MMP-2) в сыворотке крови измеряли ИФА-набором фирмы «Quantikine» (Миннеаполис, США). Уровень sFAS-лиганда в сыворотке крови животных измеряли иммуноферментным методом с помощью наборов реактивов компании «eBioscience» (Вена, Австрия).

Белковый спектр сыворотки крови изучали турбидиметрическим методом [13]. Изучение содержания белков с различными молекулярными массами в сыворотке крови проводили с помощью денатурирующего диск-электрофореза в полиакриламидном геле.

Статистический анализ проводили с помощью приложения «GraphPad Prism 5» для операционной системы Windows. Различия между независимыми группами определяли с помощью непараметрического u -критерия Манна-Уитни и считали статистически достоверными при $p < 0,05$. Числовые значения параметров указаны в виде медианы и интерквартильного размаха. Для оценки степени корреляционной зависимости рассчитывали коэффициент корреляции Спирмена.

Результаты и обсуждение

Известно, что энтероциты и лейкоциты участвуют в воспалительном ответе, продуцируя активные формы кислорода (АФК) и цитокины, что обусловило актуальность изучения особенностей цитокинового спектра и состояния системы перекисного окисления липидов (ПОЛ) / антиоксидантной системы (АОС).

Принимая во внимание тот факт, что эксперименты по кормлению лабораторных животных каррагинаном указывают на то, что пищевой каррагинан экскретируется с фекалиями в том же количестве, в котором был употреблен, и не всасывается в кишечнике [14], а также способность каррагинана непосредственно индуцировать генерацию АФК в энтероцитах [15] и лейкоцитах, локализованных в кишечнике, можно предположить, что триггером каррагинан-индуцированного воспаления кишечника является массивная генерация АФК энтероцитами и активированными лейкоцитами. Локальная гиперпродукция АФК приводит к активации свободнорадикальных процессов, в частности ПОЛ и ОМБ, ведущими к дестабилизации мембран энтероцитов, что подтверждается в нашем эксперименте. При двухнедельном употреблении каррагинана повышалась концентрация ТБК-активных продуктов (6,54 [5,93; 6,78] мкМ/г белка против у контроля 1,66 [1,58; 1,73] мкМ/г белка, $p < 0,001$), диеновых конъюгатов (104,7 [98,45; 107,1] мкМ/г белка на фоне 39,65 [38,96; 40,12] мкМ/г белка у контроля, $p < 0,001$) и карбонилированных белков (0,411 [0,389; 0,427] у.е./л и 0,107 [0,104; 0,112] у.е./л соответственно, $p < 0,001$) [16, 17]. При дальнейшем прогрессировании заболевания (четырёхнедельное употребление каррагинана) значения вышеуказанных параметров снижались, однако достоверно превышали аналогичные показатели контрольной группы [16, 17].

Мы полагаем, что активация ПОЛ приво-

дит к повреждению мембран эритроцитов, что влияет на всасывание и биодоступность нутриентов, в частности витаминов-антиоксидантов, и приводит к угнетению антиоксидантной системы (уровни общей антиоксидантной активности – 0,72 [0,65; 0,81] ед/мл у животных второй группы против 1,86 [1,79; 1,92] ед/мл у контроля, $p < 0,001$), что способствует развитию окислительного стресса [16, 17]. Установлено, что важнейшими факторами инициации и прогрессирования каррагинан-индуцированного ГЭК являются цитокины ФНО- α , ИЛ-1 α , ИЛ-4, MCP-1, которые имеют плейотропный эффект. Показано, что развитие каррагинан-индуцированного ГЭК сопровождается повышением содержания ФНО- α , ИЛ-1 α , ИЛ-4 и MCP-1 в сыворотке крови. При этом уровни вышеуказанных цитокинов у животных второй группы достоверно выше по сравнению с первой группой [18-22]. Вклад ФНО- α и ИЛ-4 в развитие каррагинан-индуцированного воспаления может быть обусловлен повреждением эпителиального барьера кишечника, что, соответственно, может вызвать повышение проницаемости слизистой оболочки кишечника для люминальных антигенов и транслокацию бактерий-комменсалов с их последующим включением в патологический процесс [22]. Это предположение подтверждается развитием гипергамаглобулинемии, которая характерна для экспериментальных животных 1-й и 2-й групп и наиболее выражена через 4 недели после употребления пищевой добавки каррагинан и, вероятно, является ответом на включение в патологический процесс люминальных бактерий [22].

Известно, что провоспалительные цитокины ФНО- α и ИЛ-1 α , действуя синергично, индуцируют острофазовый ответ, в том числе и при заболеваниях желудочно-кишечного тракта [23]. Таким образом, влиянием данных цитокинов можно объяснить обнаруженное нами развитие диспротеинемии с повышением α_1 -глобулинов и α_2 -глобулинов на более ранних стадиях хронического ГЭК [23].

Еще одним патогенетическим фактором, действие которого опосредовано провоспалительными цитокинами и способствует прогрессированию и хронизации каррагинан-индуцированного интестинального воспаления, является неоангиогенез. Об активации неоангиогенеза свидетельствует достоверное ($p < 0,01$) повышение сывороточного уровня VEGF у животных второй группы (73,64 [66,24; 82,15] мкг/мл на фоне 30,02

[24,95; 42,27] мкг/мл у контроля) [21].

Принимая во внимание способность ФНО- α индуцировать экспрессию VEGF, мы провели корреляционный анализ с целью установления корреляционной зависимости между сывороточными уровнями ФНО- α и VEGF. Обнаружено наличие средней положительной корреляционной связи ($r = +0,57$), что позволяет предположить вовлечение ФНО- α в активацию неоангиогенеза при каррагинан-индуцированном гастроэнтероколите.

Действие провоспалительных цитокинов ФНО- α и ИЛ-1 α на фоне оксидативного стресса приводит к активации апоптотических процессов в кишечнике. Известно, что оксидативный стресс индуцирует экспрессию FasL Т-лимфоцитами, а также эпителиальными клетками кишечника [24]. Обнаружено повышение содержания sFasL в сыворотке крови животных опытных групп (0,79 [0,56; 2,76] нг/мл и 0,30 [0,27; 0,33] нг/мл против 0,17 [0,08; 0,31] нг/мл в контроле), более выраженное у крыс из первой группы [25]. Таким образом, sFasL-опосредованный апоптоз является основным путем запрограммированной клеточной гибели на ранних стадиях хронического каррагинан-индуцированного ГЭК. Известно, что взаимодействие sFasL с Fas-рецептором приводит к кластеризации рецепторных доменов с последующей активацией FAS-ассоциированного домена смерти, который в свою очередь активирует прокаспазу-8, что непосредственно, путем частичного протеолиза, или опосредованно, через высвобождение митохондриями цитохрома с, приводит к активации прокаспазы-9 и вызывает образование активной эффекторной каспазы-3 из прокаспазы-3. Каспаза-3 представляет собой основную эффекторную каспазу, которая расщепляет клеточные субстраты, реализуя апоптотический каскад. Каспаза-3 активирует апоптотическую ДНК фрагментацию [26], что является терминальной стадией апоптоза. У животных с каррагинан-индуцированным гастроэнтероколитом обнаружено достоверное повышение уровня каспазы-3 в сыворотке крови (34,66 [30,40; 38,20] нг/мл у крыс из второй группы против 0,93 [0,65; 1,14] нг/мл у контроля, $p < 0,0001$) на фоне повышения процента фрагментированных ДНК в гомогенате тонкого кишечника (23,80 [23,00; 24,70] % и 15,50 [15,00; 16,70] % соответственно, $p < 0,001$) [27].

Другим патогенетическим механизмом апоптоза эритроцитов при каррагинан-инду-

цированном воспалении является ФНО- α -опосредованный апоптоз – ключевой механизм апоптоза на более поздних стадиях хронического каррагинан-индуцированного ГЭК. Так, активация ASK-1, которая происходит при каррагинан-индуцированном ГЭК (активность фермента в гомогенате кишечника животных второй группы – 4,45 [4,27; 4,59] ед/мин. мг белка и 1,79 [1,72; 1,80] ед/мин. мг белка у контроля, $p < 0,001$), индуцируется именно ФНО- α и АФК [28], кроме того, ASK-1 не рекрутируется при FasL-индуцированном апоптозе [29]. Также известно, что ASK-1 оказывает провоспалительный эффект путем стимуляции синтеза провоспалительных цитокинов, таких как ИЛ-1, ФНО- α , что усиливает воспалительный ответ. Повышенная генерация АФК и синтез ФНО- α активированными лейкоцитами приводит к активации ASK-1, что, в свою очередь, стимулирует апоптоз в энтероцитах и усиливает иммунный ответ путем усиления выработки провоспалительных цитокинов. Вновь синтезированный ФНО- α активирует ASK-1, усиливает апоптоз и выработку провоспалительных цитокинов. Тем самым возникает порочный круг.

Кроме того, активированная каспаза-3 расщепляет ПАРП, что приводит к снижению репаративных возможностей энтероцитов и увеличению процента фрагментированных молекул ДНК. Показано, что при каррагинан-индуцированном ГЭК происходит снижение активности ПАРП в гомогенате тонкого кишечника на фоне статистически достоверного ($p < 0,001$) повышения уровня каспазы-3 (0,47 [0,42; 0,50] мкмоль/мг белка у животных второй группы и 1,39 [1,30; 1,42] мкмоль/мг белка у контроля) [27]. Помимо каспазы-3 ПАРП расщепляется и инактивируется под действием ММР-2, уровень которой в сыворотке крови больных животных также повышается (7,29 [6,87; 7,72] нг/мл в контроле против 22,25 [19,76; 26,16] нг/мл у животных первой группы и 11,31 [10,73; 12,37] нг/мл – во второй, $p < 0,001$ и $p < 0,01$) [27].

Снижение активности ПАРП при повышении содержания каспазы-3 и ММР-2 при развитии хронического каррагинанового интестинального воспаления указывает на активацию апоптотических процессов и, возможно, свидетельствует о наличии вторичного некроза при развитии патологического процесса у экспериментальных животных. Кроме деградации ПАРП, ММР-2 разрушает коллаген IV типа, который является основным компонентом базальных мембран [30].

Обнаруженное нами при морфологическом исследовании препаратов тонкого кишечника истончение базальной мембраны и исчезновение ее в некоторых участках может быть обусловлено активацией ММР-2 [31, 32]. Продукция ММР-2 приводит к ускорению деградации и ремоделирования внеклеточного матрикса. ФНО- α стимулирует секрецию ММР-2 [33], что позволяет предположить важную роль данного цитокина в ремоделировании внеклеточного матрикса при хроническом каррагинан-индуцированном ГЭК. Таким образом, более выраженное повышение активности ММР-2 в сыворотке крови на ранних стадиях воспаления свидетельствует о большей интенсивности процессов ремоделирования внеклеточного матрикса на ранних стадиях хронического ГЭК, по сравнению с более поздними стадиями интестинального воспаления, что позволяет предположить протекание воспаления с чередованием фаз разрушения и пролиферации клеток.

Обнаружена усиленная гибель эпителиоцитов слизистой оболочки путем апоптоза или вторичного некроза, что сопровождается активацией пролиферативных процессов, о чем свидетельствует усиление экспрессии антигена Ki-67 [34]. Активная пролиферация эпителиоцитов является репаративной реакцией организма на прием каррагинана, при этом при 4-недельном сроке процесс находился в пределах пролиферативных ресурсов слизистой оболочки тонкого кишечника.

Еще одним эффектом провоспалительных цитокинов ФНО- α и ИЛ-1 α является стимуляция синтеза эндотелина-1. Каррагинан-индуцированный ГЭК сопровождается повышением уровней эндотелина-1 (контроль – 2,44 [1,79; 3,11] пкг/г белка, первая группа – 4,21 [3,95; 4,55] пкг/г белка, вторая группа – 6,72 [6,51; 6,90] пкг/г белка, $p < 0,01$ и $p < 0,001$) [34]. Известно, что эндотелин-1 снижает продукцию и биодоступность оксида азота, а также экспрессию NO-синтазы в эндотелиальных клетках [35], что может объяснить обнаруженное при проведении эксперимента снижение активности eNOS (0,75 [0,72; 0,76] нмоль/г белка у контроля против 0,61 [0,60; 0,63] нмоль/г белка и 0,55 [0,54; 0,58] нмоль/г белка в первой и второй группах соответственно при $p < 0,001$ и $p < 0,001$) [34]. Альтернативный механизм, потенциально связывающий эндотелин-1 и NO, опосредован образованием АФК под действием эндотелина-1, что приводит к снижению биодоступности оксида азота через генерацию перок-

синитрита. Этот механизм может вносить вклад в развитие и усиление оксидативного стресса при хроническом каррагинан-индуцированном ГЭК.

Обнаруженное снижение активности eNOS приводит к снижению конститутивной продукции оксида азота, что может служить важным фактором дальнейшего прогрессирования воспалительного процесса желудочно-кишечного тракта, поскольку eNOS-продуцируемый NO вовлечен в регуляцию целого ряда процессов в кишечнике, включая поддержание адекватной перфузии кишечника, регуляцию микрососудистой и эпителиальной проницаемости [36]. Таким образом, выявленное снижение активности eNOS, наряду с увеличением продукции ИЛ-4 и ФНО- α , вносит вклад в повышение проницаемости эпителиального барьера тонкого кишечника с последующим возможным вовлечением в патологический процесс люминальной микрофлоры. Известно, что eNOS-продуцируемый NO имеет противовоспалительное влияние, которое обусловлено ингибирующим влиянием оксида азота на хемотаксис и адгезию лейкоцитов. Следовательно, снижение активности eNOS при хроническом каррагинан-индуцированном ГЭК вносит вклад в вовлечение в патологический процесс все новых и новых иммунокомпетентных клеток, стимулируя хронизацию воспаления.

Помимо этого, развитие каррагинан-индуцированного ГЭК сопровождается снижением активности iNOS (0,165 [0,159; 0,170] нмоль/г белка у контроля и 0,105 [0,103; 0,106] нмоль/г белка у животных второй группы, $p < 0,01$) [34]. Снижение активности iNOS при прогрессировании заболевания может быть обусловлено недостаточной активностью ПАРП. При отсутствии ПАРП повреждена NF- κ B-зависимая транскрипция генов, кодирующих провоспалительные медиаторы, в том числе нарушена и экспрессия iNOS [37]. NF- κ B представляет собой белок, который конститутивно присутствует в клетках, однако в цитоплазме он связан с белком-ингибитором, известным как IkB. Этот белок подлежит немедленной деградации при связывании ФНО- α с рецепторами клеток, что приводит к высвобождению NF- κ B и последующей экспрессии провоспалительных генов, включая iNOS. Однако для экспрессии некоторых провоспалительных генов, но не всех, необходима ассоциация NF- κ B с ПАРП [37]. К таким генам относится и ген iNOS. Поскольку наблюдается снижение активности ПАРП, снижена и NF- κ B-зависимая экс-

прессия iNOS. Этот механизм может обусловить выявленное снижение активности iNOS на фоне повышения провоспалительных цитокинов ФНО- α и ИЛ-1 α . Такое снижение продукции NO iNOS, которая является одним из самых мощных генераторов свободных радикалов, может свидетельствовать об адаптации крыс и о развитии частичного компенсаторного ответа. Снижение активности iNOS при 4-недельном применении каррагинана обуславливает и менее выраженную активность свободнорадикальных процессов при прогрессировании хронического каррагинан-индуцированного интестинального воспаления [16, 17].

Стоит отметить, что обнаруженный дисбаланс между вазоконстрикторами и вазодилаторами при хроническом каррагинан-индуцированном ГЭК указывает на наличие нарушений микроциркуляции и развитие эндотелиальной дисфункции.

Полученные результаты позволяют сделать вывод, что ключевыми факторами развития и прогрессирования хронического каррагинан-индуцированного ГЭК являются оксидативный стресс и секреция активированными макрофагами провоспалительных цитокинов ФНО- α , ИЛ-1 α и противовоспалительного ИЛ-4, действие которых приводит к развитию эндотелиальной дисфункции, активации апоптоза энтероцитов с развитием компенсаторных регенераторных изменений, ремоделированию внеклеточного матрикса, увеличению проницаемости эпителиального барьера слизистой оболочки кишечника с подключением в патологический процесс люминальной микрофлоры, активации процессов неоангиогенеза в кишечнике.

Полученные в результате исследования данные позволили нам составить схему патогенеза каррагинан-индуцированного гастроэнтероколита (рис. 1).

Заключение

Триггером развития каррагинан-индуцированного гастроэнтероколита является непосредственное воздействие каррагинана на эпителиальную выстилку и макрофаги желудочно-кишечного тракта. Действие каррагинана сопровождается генерацией АФК энтероцитами и лейкоцитами, что приводит к развитию оксидативного стресса с последующей активацией апоптоза через sFASL, каспазу-3 и ASK-1. Ответ-

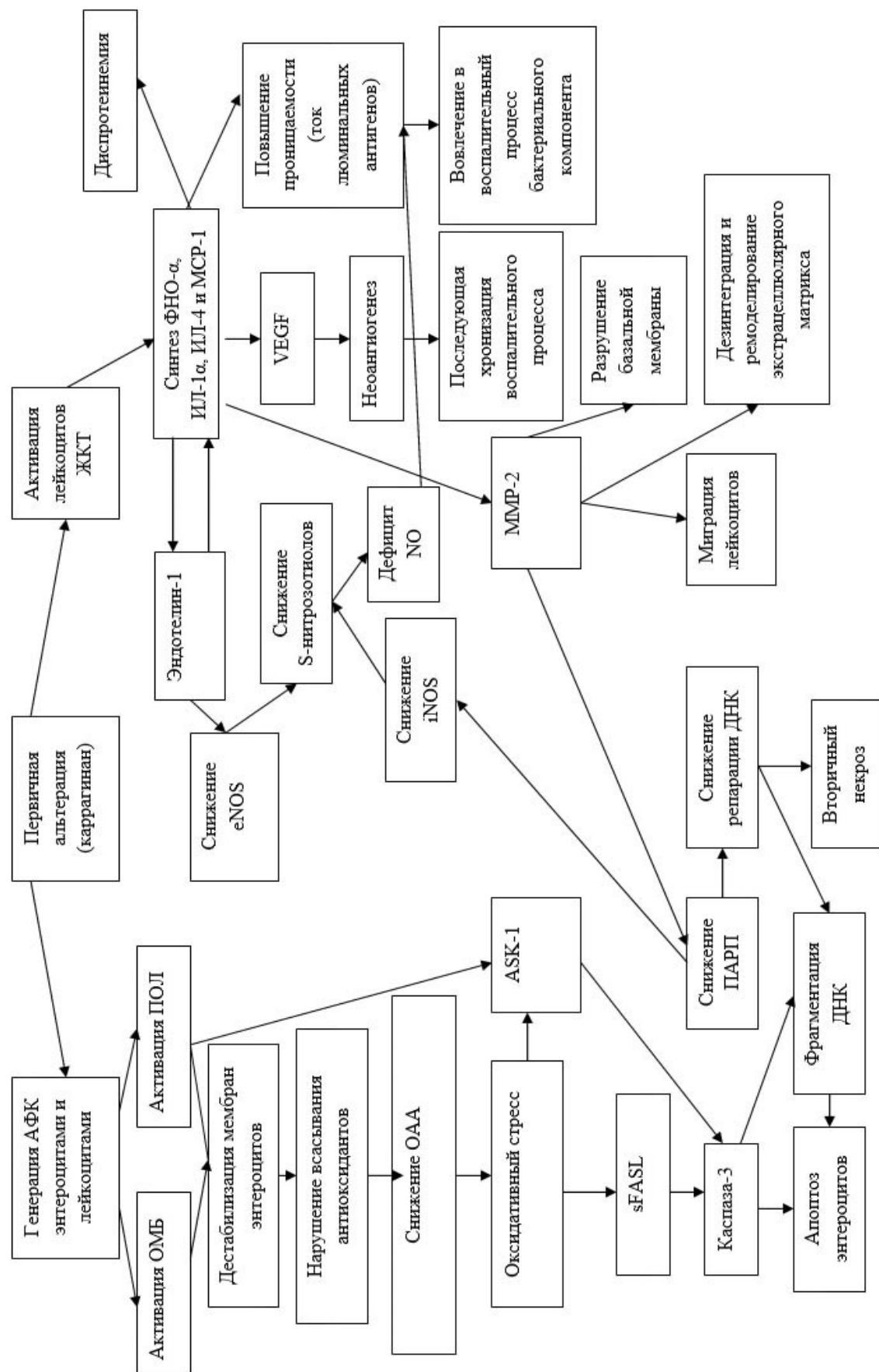


Рисунок 1 – Патогенез каррагинан-индуцированного гастроэнтероколита.

том на апоптоз является пролиферация энтероцитов тонкого кишечника, уровень которой недостаточен для компенсации потери погибших клеток. Активация макрофагов каррагинаном сопровождается гиперпродукцией цитокинов ФНО- α , ИЛ-1 α и ИЛ-4, действие которых вносит вклад в активацию неоангиогенеза, развитию эндотелиальной дисфункции в сосудах тонкого кишечника и повышению проницаемости эпителиального барьера кишечника с последующим вовлечением бактериального компонента.

Литература

- Kozłowska, J. Carrageenan-based hydrogels: effect of sorbitol and glycerin on the stability, swelling and mechanical properties / J. Kozłowska, K. Pauter, A. Sionkowska // *Polymer Testing*. – 2018 May. – Vol. 67. – P. 7–11.
- Osthole attenuates the development of carrageenan-induced lung inflammation in rats / Z. Li [et al.] // *Int. Immunopharmacol.* – 2014 May. – Vol. 20, N 1. – P. 33–36.
- The analgesic efficacy of intra-articular acetaminophen in an experimental model of carrageenan-induced arthritis / O. Arun [et al.] // *Pain Res. Manag.* – 2013 Sep-Oct. – Vol. 18, N 5. – P. e63–e67.
- Evaluation of the anti-inflammatory activity of riparin II (O-methyl-N-2-hydroxy-benzoyl tyramine) in animal models / A. M. de Carvalho [et al.] // *Chem. Biol. Interact.* – 2013 Oct. – Vol. 205, N 3. – P. 165–172.
- Лилли, Р. Патогистологическая техника и практическая гистохимия : пер. с англ. / Р. Лилли ; ред. В. В. Португалов. – М. : Мир, 1969. – 645 с.
- Бабиченко, И. И. Новые методы иммуногистохимической диагностики опухолевого роста : учеб. пособие / И. И. Бабиченко, В. А. Ковязин. – М. : РУДН, 2008. – 109 с.
- Галитовский, В. Е. Ингибиторы энергетики митохондрий предотвращают межнуклеосомную фрагментацию ДНК в тимоцитах / В. Е. Галитовский, В. Г. Гогвадзе // *Биохимия*. – 1998. – № 12. – С. 1616–1620.
- Федорова, Т. К. Реакция с ТБК для определения МДА крови методом флюориметрии / Т. К. Федорова, Т. С. Коршунова, Э. Т. Ларская // *Лаборатор. дело*. – 1983. – № 3. – С. 25–28.
- Гаврилов, Б. В. СФ-метрическое определение содержания ГПЛ в плазме крови / Б. В. Гаврилов, М. И. Мишкорудная // *Лаборатор. дело*. – 1983. – № 3. – С. 33–36.
- Антиоксидантная активность сыворотки крови / Г. И. Клебанов [и др.] // *Вестн. РАМН*. – 1999. – № 2. – С. 15–22.
- Окислительная модификация белков плазмы крови больных психиатрическими расстройствами (депрессия, деперсонализация) / Е. Е. Дубинина [и др.] // *Вопр. мед. химии*. – 2000. – Т. 46, № 4. – С. 398–409.
- Особливості утворення азоту оксиду до та після операції при вроджених вадах серця з легеневою гіпертензією / М. Ф. Зінковський [и др.] // *Серце і судини*. – 2005. – № 1. – С. 47–50.
- Клиническая лабораторная диагностика в ветеринарии : справоч. изд. / И. П. Кондрахин [и др.]. М. : Агропромиздат, 1985. – 287 с.
- Uno, Y. Molecular weight and fecal excreted quantity of carrageenan administered to rats in blended feed / Y. Uno, T. Omoto, Y. Goto // *Jpn. J. Food Chem.* – 2001 Jan. – Vol. 8. – P. 83–93.
- Bhattacharyya, S. Carrageenan-induced NF κ B activation depends on distinct pathways mediated by reactive oxygen species and Hsp27 or by Bcl10 / S. Bhattacharyya, P. K. Dudeja, J. K. Tobacman // *Biochim. Biophys. Acta*. – 2008 Jul-Aug. – Vol. 1780, N 7/8. – P. 973–982.
- Жуков, В. И. Система перекисного окисления липидов и активность апоптоза при экспериментальном хроническом гастроэнтероколите / В. И. Жуков, А. С. Ткаченко // *Науч. вед. БелГУ. Сер. Медицина. Фармация*. – 2013. – Т. 23, № 18. – С. 138–141.
- Ткаченко, А. С. Стан прооксидантно-антиоксидантної системи при хронічному експериментальному гастроентероколіті / А. С. Ткаченко, В. Г. Гопкалов // *Вісн. проблем біології і медицини*. – 2014. – Т. 1, № 1. – С. 194–199.
- Содержание моноцитарного хемоаттрактантного белка 1 (MCP-1) при каррагенан-индуцированном гастроэнтероколите / А. С. Ткаченко [и др.] // *Проблемы здоровья и экологии*. – 2017. – № 2. – С. 64–67.
- Содержание матриксной металлопротеиназы-9 и ФНО- α в сыворотке крови при употреблении пищевой добавки E407 / А. С. Ткаченко [и др.] // *Сучасні медичні технології*. – 2017. – № 1. – С. 40–43.
- Жуков, В. И. Уровень фактора некроза опухолей альфа и активность матриксной металлопротеиназы-2 при хроническом каррагенан-индуцированном гастроэнтероколите / В. И. Жуков, А. С. Ткаченко // *Науч. вед. БелГУ. Сер. Медицина. Фармация*. – 2014. – Т. 27, № 18. – С. 150–153.
- Ткаченко, А. С. Уровень VEGF и ФНО- α при хроническом каррагенан-индуцированном гастроэнтероколите / А. С. Ткаченко // *Вісн. проблем біології і медицини*. – 2013. – Т. 2, № 3. – С. 231–234.
- Ткаченко, А. С. Особливості білкового спектру і цитокінового складу сироватки крові щурів при хронічному карагенан-індукованому інтестинальному запаленні / А. С. Ткаченко, Т. В. Горбач, О. М. Пономаренко // *Актуальні питання фармац. і мед. науки та практики*. – 2014. – № 1. – С. 73–75.
- Bile synthesis in rat models of inflammatory bowel diseases / N. Dikopoulos [et al.] // *Eur. J. Clin. Invest.* – 2007 Mar. – Vol. 37, N 3. – P. 222–230.
- Oxidative stress induces the expression of Fas and Fas ligand and apoptosis in murine intestinal epithelial cells / T. L. Denning [et al.] // *Free Radic. Biol. Med.* – 2002 Dec. – Vol. 33, N 12. – P. 1641–1650.
- Ткаченко, А. С. FASL-индуцированный апоптоз при хроническом карагенановом гастроэнтероколите / А. С. Ткаченко // *Буков. мед. вестн.* – 2014. – Т. 18, № 1. – С. 117–119.
- Identification of ICAD-derived peptides capable of inhibiting caspase-activated DNase / D. Kutscher [et al.] // *FEBS J.* – 2012 Aug. – Vol. 279, N 16. – P. 2917–2928.
- Proteolytic degradation of poly (ADP-ribose) polymerase

- in rats with carrageenan-induced gastroenterocolitis / A. S. Tkachenko [et al.] // Вісн. ХНУ ім. Б. Н. Каразіна. Сер. Медицина. – 2017. – № 34. – С. 41–46.
28. Atmospheric gas plasma-induced ROS production activates TNF-ASK1 pathway for the induction of melanoma cancer cell apoptosis / M. Ishaq [et al.] // Mol. Biol. Cell. – 2014 May. – Vol. 25, N 9. – P. 1523–1531.
 29. ASK1 is required for sustained activations of JNK/p38 MAP kinases and apoptosis / K. Tobiume [et al.] // EMBO Rep. – 2001 Mar. – Vol. 2, N 3. – P. 222–228.
 30. Enzymatic processing of collagen IV by MMP-2 (gelatinase A) affects neutrophil migration and it is modulated by extracatalytic domains / S. Monaco [et al.] // Protein Sci. – 2006 Dec. – Vol. 15, N 12. – P. 2805–2815.
 31. Губина-Вакулик, Г. А. Морфологическое состояние тонкого кишечника при длительном употреблении пищевой добавки каррагинан / Г. А. Губина-Вакулик, А. С. Ткаченко, М. А. Орлова // Вісн. проблем біології і медицини. – 2014. – Т. 3, № 2. – С. 252–257.
 32. Damage and regeneration of small intestinal enterocytes under the influence of carrageenan induces chronic enteritis / G. I. Gubina-Vakyulyk [et al.] // Com. Clin. Pathol. – 2015 Nov. – Vol. 24, N 6. – P. 1473–1477.
 33. TNF-alpha stimulates activation of pro-MMP2 in human skin through NF-(kappa)B mediated induction of MT1-MMP / Y. P Han [et al.] // J. Cell Sci. – 2001 Jan. – Vol. 114, pt. 1. – P. 131–139.
 34. Ткаченко, А. С. Система генерации оксида азота при экспериментальном гастроэнтероколите / А. С. Ткаченко, В. Г. Гопкалов, М. А. Орлова // Буков. мед. вісн. – 2014. – Т. 18, № 2. – С. 109–112.
 35. Elevated endothelin-1 levels impair nitric oxide homeostasis through a PKC-dependent pathway / D. Ramzy [et al.] // Circulation. – 2006 Jul. – Vol. 114, N 1, suppl. – P. I319–I326.
 36. Endothelial TLR4 activation impairs intestinal microcirculatory perfusion in necrotizing enterocolitis via eNOS-NO-nitrite signaling / I. Yazji [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2013 Jun. – Vol. 110, N 23. – P. 9451–9456.
 37. Resistance to endotoxic shock as a consequence of defective NF-κB activation in poly (ADP-ribose) polymerase-1 deficient mice / F. J. Oliver [et al.] // EMBO J. – 1999 Aug. – Vol. 18, N 16. – P. 4446–4454.

Поступила 07.03.2018 г.

Принята в печать 06.08.2018 г.

References

1. Kozłowska J, Pauter K, Sionkowska A. Carrageenan-based hydrogels: Effect of sorbitol and glycerin on the stability, swelling and mechanical properties. *Polymer Testing*. 2018 May;67:7-11. doi: 10.1016/j.polymertesting.2018.02.016.
2. Li Z, Ji H, Song X, Hu J, Han N, Chen N. Osthole attenuates the development of carrageenan-induced lung inflammation in rats. *Int Immunopharmacol*. 2014 May;20(1):33-6. doi: 10.1016/j.intimp.2014.02.013.
3. Arun O, Canbay O, Celebi N, Sahin A, Konan A, Atila P, et al. The analgesic efficacy of intra-articular acetaminophen in an experimental model of carrageenan-induced arthritis. *Pain Res Manag*. 2013 Sep-Oct;18(5):e63-7.
4. de Carvalho AM, Rocha NF, Vasconcelos LF, Rios ER, Dias ML, Silva MI, et al. Evaluation of the anti-inflammatory activity of riparin II (O-methyl-N-2-hydroxy-benzoyl tyramine) in animal models. *Chem Biol Interact*. 2013 Oct;205(3):165-72. doi: 10.1016/j.cbi.2013.07.007.
5. Lilli R, Portugalov VV, red. Pathohistological technique and practical histochemistry: per s angl. Moscow, RF: Mir; 1969. 645 p. (In Russ.)
6. Babichenko II, Kovyazin VA. New methods of immunohistochemical diagnosis of tumor growth: ucheb posobie. Moscow, RF: RUDN; 2008. 109 p. (In Russ.)
7. Galitovskiy VE, Gogvadze VG. Inhibitors of mitochondrial energy minucioso prevent DNA fragmentation in thymocytes. *Biokhimiia*. 1998;(12):1616-20. (In Russ.)
8. Fedorova TK, Korshunova TS, Larskaya ET. The reaction with TBA to determine the MDA blood method fluometry. *Laborator Delo*. 1983;(3):25-8. (In Russ.)
9. Gavrilov BV, Mishkorudnaya MI. SF-metric determination of GPL content in blood plasma. *Laborator Delo*. 1983;(3):33-6. (In Russ.)
10. Klebanov GI, Teselkin YuO, Babenkova IV, Lyubitskiy OB, Vladimirov YuA. Antioxidant activity of blood serum. *Vestn RAMN*. 1999(2):15-22. (In Russ.)
11. Dubinina EE, Morozova MG, Leonova NV, Gamper NL, Soliternova IB, Nuller YuL, i dr. Oxidative modification of plasma proteins in patients with psychiatric disorders (depression, depersonalization). *Vopr Med Khimii*. 2000;46(4):398-409. (In Russ.)
12. Zin'kovskiy MF, Gula NM, Kosyakova GV, Dovgan' AM, Atamanyuk MYu. Features of the formation of nitrogen oxide before and after surgery for congenital heart diseases with pulmonary hypertension. *Sertse i sudini*. 2005;(1):47-50. (In Ukr.)
13. Kondrakhin IP, Kurilov NV, Malakhov AG, i dr. Clinical laboratory diagnostics in veterinary medicine: spravoch. izd. Moskva, RF: Agropromizdat; 1985. 287 p. (In Russ.)
14. Uno Y, Omoto T, Goto Y. Molecular weight and fecal excreted quantity of carrageenan administered to rats in blended feed. *Jpn J Food Chem*. 2001 Jan;8:83-93.
15. Bhattacharyya S, Dudeja PK, Tobacman JK. Carrageenan-induced NFκB activation depends on distinct pathways mediated by reactive oxygen species and Hsp27 or by Bcl10. *Biochim Biophys Acta*. 2008 Jul-Aug;1780(7-8):973-82. doi: 10.1016/j.bbagen.2008.03.019.
16. Zhukov VI, Tkachenko AS. The system of lipid peroxidation and activity of apoptosis in experimental chronic gastroenterocolitis. *Nauch Ved BelGU Ser Meditsina Farmatsiia*. 2013;23(18):138-41. (In Russ.)
17. Tkachenko AS, Gopkalov VG. The state of prooxidant-antioxidant system in chronic experimental gastroenterocolit. *Visn Problem Biologii Meditsini*. 2014;1(1):194-9. (In Ukr.)
18. Tkachenko AS, Nakonechnaya OA, Gorbach TV, Onishchenko AI, Chubukova TN. Content of monocytic chemoattractant protein 1 (MSR-1) in carrageenan-induced gastroenterocolitis. *Problemy Zdorov'ia Ekologii*. 2017;(2):64-7. (In Russ.)
19. Tkachenko AS, Zhukov VI, Gorbach TV, Vasil'yeva IM,

- Tkachenko MA. The content of matrix metalloproteinase-9 and TNF- α in blood serum when using food additive E407. *Suchasni Medichni Tekhnologii*. 2017;(1):40-3. (In Russ.)
20. Zhukov VI, Tkachenko AS. Level of tumor necrosis factor alpha and matrix metalloproteinase-2 activity in chronic carrageenan-induced gastroenterocolitis. *Nauch Ved BelGU Ser Meditsina Farmatsiia*. 2014;27(18):150-3. (In Russ.)
21. Tkachenko AS. VEGF and TNF- α levels in chronic carrageenan-induced gastroenterocolitis. *Visn Problem Biologii Meditsini*. 2013;2(3):231-4. (In Russ.)
22. Tkachenko AS, Gorbach TV, Ponomarenko OM. Features of the protein spectrum and cytokine composition of blood serum of rats with chronic carrageenan-induced inflammation intestinal. *Aktual'ni Pitannia Farmats Med Nauki Praktiki*. 2014;(1):73-5. (In Ukr.)
23. Dikopoulos N, Schmid RM, Bachem M, Buttenschon K, Adler G, Chidi JY, et al. Bile synthesis in rat models of inflammatory bowel diseases. *Eur J Clin Invest*. 2007 Mar;37(3):222-30.
24. Denning TL, Takaishi H, Crowe SE, Boldogh I, Jevnikar A, Ernst PB. Oxidative stress induces the expression of Fas and Fas ligand and apoptosis in murine intestinal epithelial cells. *Free Radic Biol Med*. 2002 Dec;33(12):1641-50.
25. Tkachenko AS. FASL-induced apoptosis in chronic karatanova the gastroenterocolitis. *Bukov Med Vestn*. 2014;18(1):117-9. (In Russ.)
26. Kutscher D, Pingoud A, Jeltsch A, Meiss G. Identification of ICAD-derived peptides capable of inhibiting caspase-activated DNase. *FEBS J*. 2012 Aug;279(16):2917-28. doi: 10.1111/j.1742-4658.2012.08673.x.
27. Tkachenko AS, Nakonechna OA, Zhukov VI, Gorbach TV, Tkachenko MO. Proteolytic degradation of poly (ADP-ribose) polymerase in rats with carrageenan-induced gastroenterocolitis. *Visn KhNU im VN Karazina Ser Meditsina*. 2017;(34):41-6.
28. Ishaq M, Kumar S, Varinli H, Han ZJ, Rider AE, Evans MD, et al. Atmospheric gas plasma-induced ROS production activates TNF-ASK1 pathway for the induction of melanoma cancer cell apoptosis. *Mol Biol Cell*. 2014 May;25(9):1523-31. doi: 10.1091/mbc.E13-10-0590.
29. Tobiume K, Matsuzawa A, Takahashi T, Nishitoh H, Morita K, Takeda K, et al. ASK1 is required for sustained activations of JNK/p38 MAP kinases and apoptosis. *EMBO Rep*. 2001 Mar;2(3):222-8.
30. Monaco S, Sparano V, Gioia M, Sbardella D, Di Pierro D, Marini S, et al. Enzymatic processing of collagen IV by MMP-2 (gelatinase A) affects neutrophil migration and it is modulated by extracatalytic domains. *Protein Sci*. 2006 Dec;15(12):2805-15. doi: 10.1110/ps.062430706
31. Gubina-Vakulik GA, Tkachenko AS, Orlova MA. Morphological state of the small intestine in the long-term use of food additives carrageenan. *Visn Problem Biologii Meditsini*. 2014;3(2):252-7. (In Russ.)
32. Gubina-Vakyulyk GI, Gorbach TV, Tkachenko AS, Tkachenko MO. Damage and regeneration of small intestinal enterocytes under the influence of carrageenan induces chronic enteritis. *Com Clin Pathol*. 2015 Nov;24(6):1473-7. doi: 10.1007/s00580-015-2102-3.
33. Han YP, Tuan TL, Wu H, Hughes M, Garner WL. TNF- α stimulates activation of pro-MMP2 in human skin through NF-(kappa)B mediated induction of MT1-MMP. *J Cell Sci*. 2001 Jan;114(Pt 1):131-139.
34. Tkachenko AS, Gopkalov VG, Orlova MA. System of nitrogen oxide generation in experimental gastroenterocolitis. *Bukov Med Visn*. 2014;18(2):109-2. (In Russ.)
35. Ramzy D, Rao V, Tumati LC, Xu N, Sheshgiri R, Miriuka S, et al. Elevated endothelin-1 levels impair nitric oxide homeostasis through a PKC-dependent pathway. *Circulation*. 2006 Jul;114(1 Suppl):I319-26. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.001503/
36. Yazji I, Sodhi CP, Lee EK, Good M, Egan CE, Afrazi A, et al. Endothelial TLR4 activation impairs intestinal microcirculatory perfusion in necrotizing enterocolitis via eNOS-NO-nitrite signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Jun;110(23):9451-6. doi: 10.1073/pnas.1219997110.
37. Oliver FJ, Ménéssier-de Murcia J, Nacci C, Decker P, Andriantsitohaina R, Muller S, et al. Resistance to endotoxic shock as a consequence of defective NF- κ B activation in poly (ADP-ribose) polymerase-1 deficient mice. *EMBO J*. 1999 Aug;18(16):4446-54. doi: 10.1093/emboj/18.16.4446.

Submitted 07.03.2018

Accepted 06.08.2018

Сведения об авторах:

Ткаченко А.С. – к.м.н., ассистент кафедры биологической химии Харьковского национального медицинского университета, Украина;

Жуков В.И. – д.м.н., профессор кафедры биологической химии Харьковского национального медицинского университета, Украина;

Губина-Вакулик Г.И. – д.м.н., профессор кафедры патологической анатомии Харьковского национального медицинского университета, Украина;

Наконечная О.А. – д.м.н., профессор, заведующая кафедрой биологической химии Харьковского национального медицинского университета, Украина;

Горбач Т.В. – к.б.н., доцент кафедры биологической химии Харьковского национального медицинского университета, Украина;

Онищенко А.И. – очный аспирант кафедры биологической химии Харьковского национального медицинского университета, Украина;

Ткаченко М.А. – врач-интерн Харьковской городской клинической больницы № 27, Украина.

Information about authors:

Tkachenko A.S. – Candidate of Medical Sciences, lecturer of the Chair of Biochemistry, Kharkov National Medical University;

Zhukov V.I. – Doctor of Medical Sciences, professor of the Chair of Biochemistry, Kharkov National Medical University;

Gubina-Vakulyck G.I. – Doctor of Medical Sciences, professor of the Chair of Pathological Anatomy, Kharkov National Medical University;

Nakonechna O.A. – Doctor of Medical Sciences, professor, head of the Chair of Biochemistry, Kharkov National Medical University;

Gorbatch T.V. – Candidate of Biological Sciences, associate professor of the Chair of Biochemistry, Kharkov National Medical University;

Onishchenko A.I. – postgraduate of the Chair of Biochemistry, Kharkov National Medical University;

Tkachenko M.A. – intern, Kharkov Municipal Clinical Hospital No. 27.

Адрес для корреспонденции: Украина, 61022, г. Харьков, пр. Науки, 4, Харьковский национальный медицинский университет, кафедра биологической химии. E-mail: antontkachenko555@gmail.com – Ткаченко Антон Сергеевич.

Correspondence address: Ukraine, 61022, Kharkov, 4 Nauky ave., Kharkov National Medical University, Chair of Biochemistry. E-mail: antontkachenko555@gmail.com – Anton S. Tkachenko.