

ВЛИЯНИЕ ПИЩЕВОЙ ДОБАВКИ E407a НА ИНТЕНСИВНОСТЬ АПОПТОЗА ГРАНУЛОЦИТОВ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ IN VITRO

ТКАЧЕНКО А.С.

Харьковский национальный медицинский университет, г. Харьков, Украина

Вестник ВГМУ. – 2020. – Том 19, №2. – С. 28-34.

THE INFLUENCE OF E407a FOOD ADDITIVE ON GRANULOCYTE APOPTOSIS INTENSITY IN AN EXPERIMENT IN VITRO

TKACHENKO A.S.

Kharkiv National Medical University, Kharkiv, Ukraine

Vestnik VGMU. 2020;19(2):28-34.

Резюме.

Цель работы – изучение содержания активной каспазы-3 в гранулоцитах периферической крови крыс при краткосрочном воздействии высоких концентраций пищевой добавки E407a для оценки интенсивности процессов апоптоза.

Материал и методы. В эксперименте использовали кровь 8 крыс-самок популяции WAG, которую инкубировали с раствором полуочищенного каррагинана (E407a) с конечной концентрацией 8 г/л в течение 1 и 2 часов. Определяли уровень активной каспазы-3 в гранулоцитах методом проточной цитометрии с использованием антител к активной каспазе-3, меченных флуорохромом Alexa Fluor® 647. Оценивали количество клеток с активной каспазой-3 и среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) в каспаза-3⁺ гранулоцитах после гейтирования соответствующего региона. Статистическую обработку данных проводили с расчетом критерия Краскела-Уоллиса и post-hoc критерия Данна.

Результаты. Установлено, что краткосрочная инкубация крови экспериментальных животных с пищевой добавкой E407a не влияет на содержание активной каспазы-3 в гранулоцитах крови и MFI. Таким образом, полуочищенный каррагинан не индуцирует апоптоз гранулоцитов в эксперименте in vitro.

Заключение. Высокие концентрации пищевой добавки E407a не активируют апоптоз гранулоцитов при непосредственном воздействии.

Ключевые слова: пищевые добавки, каррагинан, E407a, апоптоз, активная каспаза-3.

Abstract.

Objectives. To analyze the content of active caspase-3 in peripheric blood granulocytes of rats exposed to short-term high concentrations of E407a food additive for the assessment of apoptosis intensity.

Material and methods. The experiment was performed using 8 female WAG rats whose blood was incubated with semi-refined carrageenan (E407a) solution at the final concentration of 8 g/L during 1 and 2 hours. The level of active caspase-3 in granulocytes was determined by flow cytometry using antibodies to active caspase-3 labelled with Alexa Fluor® 647 fluorochrome. The amount of cells with active caspase-3 and mean fluorescence intensity (MFI) in caspase-3⁺ granulocytes were evaluated after gating the corresponding region. The statistical data processing was performed by Kruskal-Wallis and post-hoc Dunn's tests.

Results. It has been shown that the short-term incubation of experimental animals blood with E407a food additive affects neither the content of active caspase-3 in blood granulocytes nor MFI. Thus, semi-refined carrageenan is not capable of inducing granulocyte apoptosis in an experiment in vitro.

Conclusions. Direct exposure of granulocytes to high concentrations of E407a food additive does not promote their apoptosis.

Key words: food additives, carrageenan, E407a, apoptosis, active caspase-3.

В современной пищевой промышленности каррагинаны являются наиболее распространенными полисахаридами морских водорослей [1]. Уникальные реологические свойства и относительно дешевизна каррагинанов позволили им занять существенную нишу на рынке пищевых добавок, где они используются в качестве загустителей, гелеобразователей и эмульгаторов. Каррагинаны разрешены для применения в продуктах питания наиболее авторитетными международными регуляторами (в частности, Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов, а также Европейским агентством по безопасности продуктов питания) и зарегистрированы в Европейском Союзе в качестве добавок E407 (очищенный каррагинан) и E407a (получищенный каррагинан). По своей структуре каррагинаны представляют собой высокомолекулярные гетерополисахариды, состоящие из повторяющихся дисахаридных фрагментов сульфатированных производных D-галактозы. В зависимости от степени сульфатированности выделяют три формы каррагинанов: κ (каппа), ι (йота) и λ (лямбда). В отличие от добавки E407, получищенный каррагинан (E407a) содержит примеси, в частности до 15% целлюлозы и следы формальдегида, однако основная масса сухого вещества представлена κ -каррагинаном [2].

Помимо пищевой промышленности, рассматривается возможность применения каррагинанов в качестве лекарственных препаратов, поскольку они обладают противовирусным, противоопухолевым и иммуномодулирующим действием [3]. Однако в научном сообществе каррагинаны активно подвергаются критике. В последние годы в нескольких работах было показано, что каррагинаны стимулируют экспрессию провоспалительных цитокинов в эпителиальных клетках кишечника, индуцируют развитие энтерита и усиливают уже имеющееся бактериальное воспаление кишечника [4-7]. В то же время некоторые авторы объясняют подобную неопределенность терминологической путаницей и указывают на тот факт, что индукторами воспаления являются низкомолекулярные производные каррагинанов – полигинан (10-20 кДа) и деградированный каррагинан (20-40 кДа), токсичность которых общепризнана. При этом высокомолекулярный пищевой каррагинан (200-800 кДа) не является токсичным при пероральном употреблении [8].

Противоречивы и данные о непосредственном воздействии каррагинанов на клетки. McKim JR et al. продемонстрировали, что пищевые каррагинаны не обладают цитотоксичностью в отношении эпителиоцитов кишечника и гепатоцитов. Помимо этого, они не усиливают свободнорадикальные процессы и экспрессию цитокинов [9]. Однако в других работах было показано, что каррагинаны индуцируют генерацию активных форм кислорода (АФК) различными типами клеток, включая нейтрофилы [10]. При этом известно, что накопление АФК в нейтрофилах индуцирует их апоптоз [11]. Данный факт обуславливает интерес к изучению влияния пищевого каррагинана на процесс апоптоза гранулоцитов – нейтрофилов, эозинофилов, базофилов.

Цель работы – изучение содержания активной каспазы-3 в гранулоцитах периферической крови крыс при воздействии высоких концентраций пищевой добавки E407a в течение 1 и 2 часов для оценки интенсивности процессов апоптоза.

Материал и методы

Эксперимент проводили на 8 половозрелых крысах-самках популяции WAG, вес которых варьировался в пределах 160-190 г. Для акклиматизации животные содержались в стандартных условиях вивария – по 4 крысы в клетке при температуре $24 \pm 2^\circ\text{C}$ и относительной влажности 50-60% в течение 2 недель. После выведения животных из эксперимента кровь собиралась в стерильные вакутейнеры, содержащие дикалийевую соль этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) для предотвращения ее сворачивания. Затем по 500 мкл крови каждого животного добавляли в две полимерные полистереновые лабораторные пробирки (контрольная и опытная группы). В образцы опытной группы добавляли раствор пищевой добавки E407a в натрий-фосфатном буфере (PBS, Becton Dickinson) с конечной концентрацией получищенного каррагинана 8 г/л в готовых пробах. В образцы контрольной группы добавляли аналогичное количество PBS, не содержащего пищевой добавки E407a. После инкубации в течение 1 и 2 часов из всех проб производился отбор 100 мкл крови для проведения проточной цитометрии.

Кровь в контрольных и опытных пробах лизировалась с помощью лизирующего раствора «FACSLyse» (Becton Dickinson, США) и дважды отмывалась в PBS буфере в соответствии с про-

токолом компании «Becton Dickinson» (Becton Dickinson Technical Support Protocol, 2002) для удаления эритроцитов. После процедуры лизирования и отмывки лейкоциты ресуспендировали в 0,5 мл раствора для фиксации и пермеабиллизации «BD Cytofix/Cytoperm™» (BD, США). Суспензии инкубировали при 4°C в течение 20 минут. Затем клетки дважды отмывали в буфере «BD Perm/Wash™» (BD, США). После отмывки лейкоциты ресуспендировали в 100 мкл «BD Perm/Wash™» и инкубировали с 20 мкл антител к активной каспазе-3, меченных флуорохромом Alexa Fluor® 647 (Alexa Fluor® 647 rabbit anti-active caspase-3, BD Pharmingen™, США) в течение 30 минут. После инкубации производилась отмывка в 1 мл «BD Perm/Wash™» с последующим ресуспендированием лейкоцитов в 500 мкл «BD Perm/Wash™». Полученные образцы анализировали на проточном цитометре «BD FACSCanto™ II» (Becton Dickinson, США). В каждой пробе проводилась регистрация 10000 событий. Приложение «BD FACSDiva™» использовали для оценки результатов. В контрольных и опытных пробах после гейтирования соответствующего региона гранулоцитов оценивали количество клеток с активной каспазой-3 и среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) в каспаза-3⁺ клетках.

Расчет мощности выборки проводили с помощью программы «G*Power 3». Значение пла-

нируемой мощности исследования равнялось 0,8, а ошибки I рода – 5%.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы «Graph Pad Prism 5.0». Для сравнения параметров трех независимых групп определяли непараметрический критерий Краскела-Уоллиса с последующим расчетом post-hoc критерия Данна. Разница считалась статистически достоверной при $p < 0,05$.

Исследование одобрено Комиссией по биоэтике Харьковского национального медицинского университета. При проведении эксперимента мы руководствовались положениями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и иных научных целях» (ETS 123).

Результаты

В данном исследовании анализировалось содержание активной каспазы-3 в гранулоцитах периферической крови после краткосрочной инкубации с пищевой добавкой E407a методом проточной цитометрии. После одновременной регистрации прямого и бокового рассеивания (FSC/SSC) в каждой пробе из трех групп проводилось гейтирование соответствующего региона гранулоцитов в зависимости от физических параметров клеток. Пример стратегии гейтирования представлен на

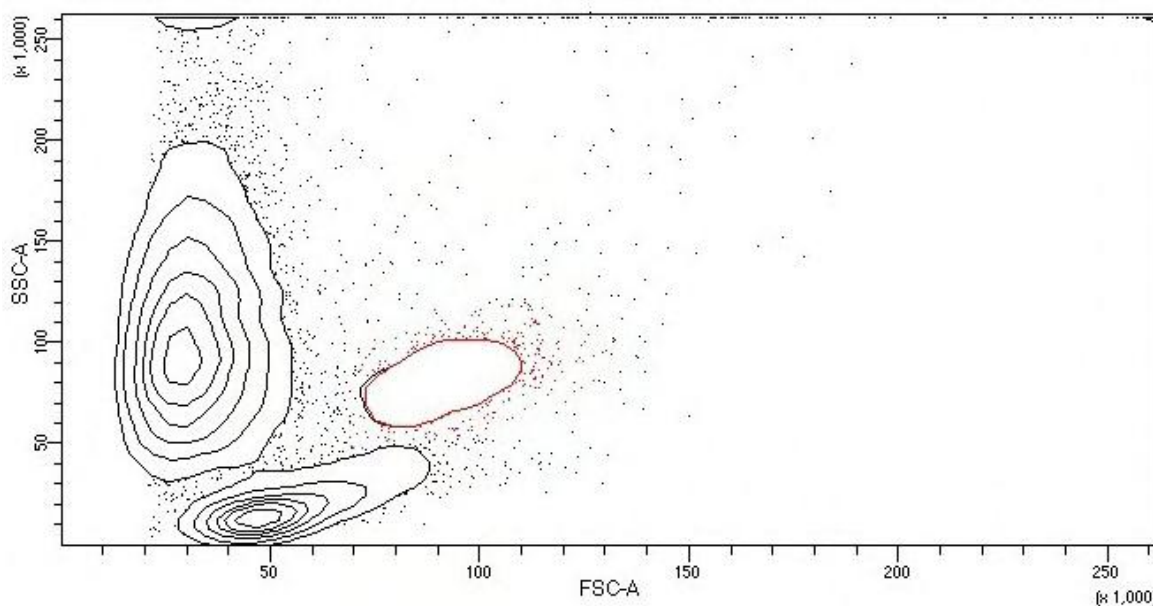


Рисунок 1 – Показана стратегия гейтирования гранулоцитов по параметрам прямого и бокового светорассеивания (FSC / SSC). Регион гранулоцитов выделен красным цветом. Анализ содержания активной каспазы-3 проводили в клетках данного гейта.

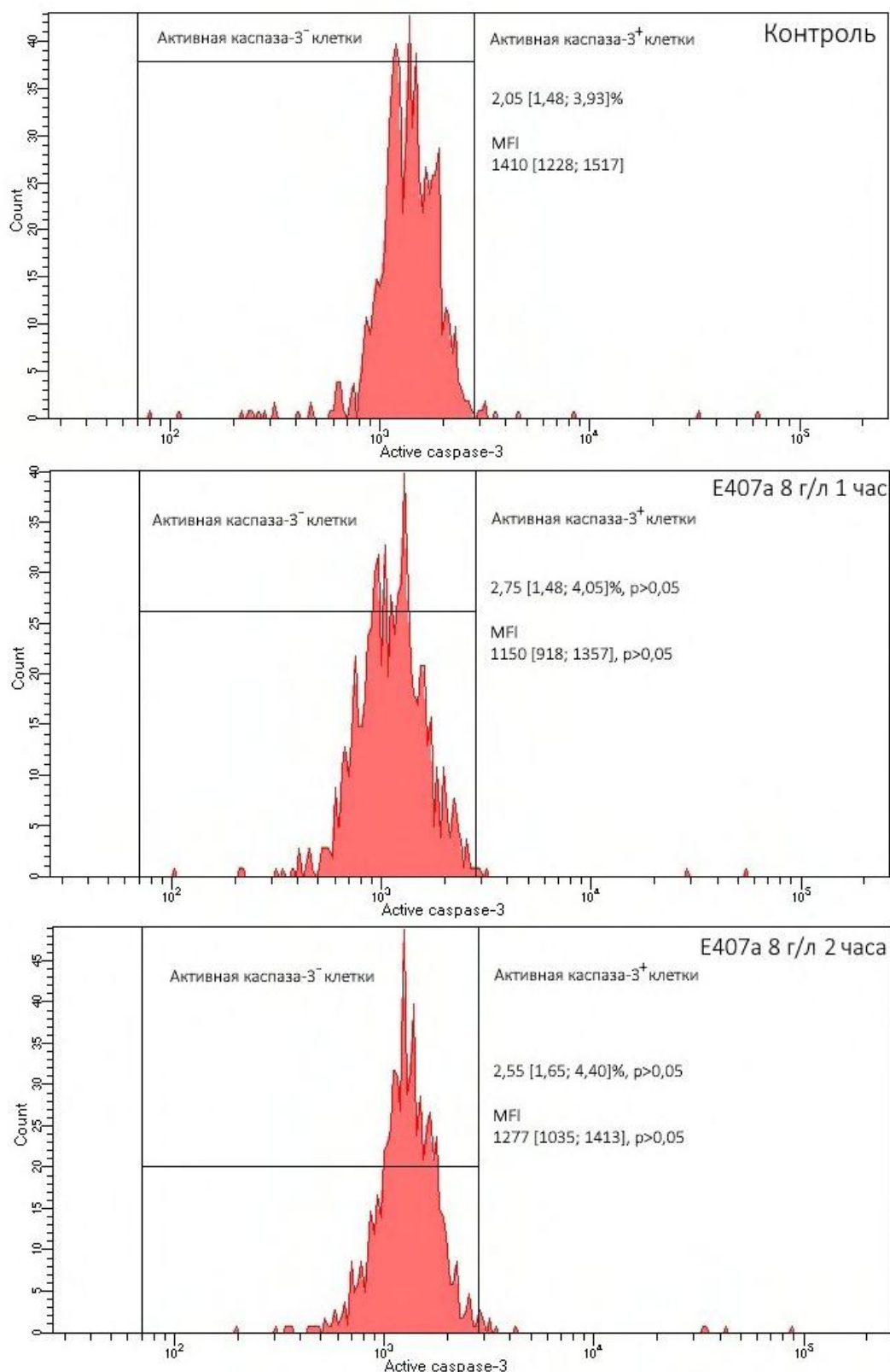


Рисунок 2 – Гистограммы по параметрам бокового светорассеивания и флуоресценции Alexa Fluor® 647 (SSC/ Active Caspase-3 Alexa Fluor® 647) контрольных образцов, а также гейтированных гранулоцитов после инкубации с пищевой добавкой E407a в течение 1 часа и 2 часов. Выделены два региона: активная каспаза-3⁻ и активная каспаза-3⁺ клетки. На рисунке представлен процент гранулоцитов с активной каспазой-3 и средняя интенсивность флуоресценции (MFI). Не обнаружено достоверной разницы в изучаемых параметрах между тремя группами, что указывает на неспособность E407a индуцировать апоптоз гранулоцитов.

рисунке 1. Затем анализировалась флуоресценция флуорохрома Alexa Fluor® 647 в вышеуказанном регионе с целью определения содержания активной формы каспазы-3 в гранулоцитах.

Установлено, что у животных контрольной группы низкая интенсивность процессов апоптоза гранулоцитов, на что указывает небольшой процент клеток, содержащих активную каспазу-3. Инкубация крови с полуочищенным каррагинаном с конечной концентрацией исследуемого вещества 8 г/л в течение 1 и 2 часов не приводила к статистически достоверным ($p > 0,05$) изменениям количества гранулоцитов с протеолитически активированной каспазой-3 (рис. 2). Таким образом, полученные данные указывают на отсутствие индукции апоптоза изучаемых клеток под действием данной добавки.

Для количественной оценки содержания активной каспазы-3 были изучены значения MFI флуорохрома Alexa Fluor® 647 в гранулоцитах в исследуемых пробах. Уровень флуоресценции пропорционален содержанию фермента в клетках. Как видно на рисунке 2, значения MFI в исследуемых группах не отличались ($p > 0,05$), что подтверждает вывод о неспособности полуочищенного каррагинана непосредственно стимулировать апоптоз гранулоцитов.

Обсуждение

Известно, что каспазы играют ключевую роль в реализации апоптоза внутри клеток. При этом эффекторная каспаза-3 объединяет как внутренний, так и внешний пути активации апоптоза, опосредуя протеолиз внутриклеточных структур, сопровождающихся гибелью клеток. Стимуляция апоптоза в клетках приводит к запуску каспазного каскада, и активированные иницирующие каспазы-8 и -9 расщепляют прокаспазу-3, превращая ее в активную каспазу-3, которую можно определить, в том числе и с помощью проточной цитометрии [12]. Следует отметить, что повышение содержания активной каспазы-3 может наблюдаться уже через 30 минут после индукции апоптоза, что и обусловило выбор данного апоптотического маркера для анализа краткосрочного влияния пищевой добавки, содержащей каррагинан, на гранулоциты [12].

Отсутствие статистически достоверных различий в количестве гранулоцитов с активной каспазой-3, а также числовыми значениями средней интенсивности флуоресценции, между

контрольными и опытными пробами позволяют сделать вывод о том, что E407a непосредственно не влияет на апоптоз гранулоцитов. Выводы данной работы согласуются с результатами, полученными McKim JR et al, и демонстрирующими отсутствие цитотоксичности у каррагинанов [9]. Однако в работе Kopynytsia et al показано, что при пероральном употреблении пищевого каррагинана (E407) развивается энтероколит, сопровождающийся активацией апоптоза лейкоцитов периферической крови [13]. Таким образом, можно предположить, что индукция апоптоза при употреблении каррагинана *per os* обусловлена не непосредственным воздействием пищевой добавки на лейкоциты, а происходит опосредовано, через развитие воспалительного ответа. В частности, Ogata et al продемонстрировали, что каррагинан может усиливать экспрессию провоспалительного цитокина фактора некроза опухолей- α (ФНО- α), индуцированную бактериальными липополисахаридами (ЛПС), в нейтрофилах [14]. При этом каррагинан не способен активировать синтез ФНО- α и других провоспалительных цитокинов в отсутствие ЛПС [9, 14]. Помимо этого, Wu et al показали, что к-каррагинан, который содержится в E407a, усиливает секрецию интерлейкина-8, обусловленную действием ЛПС, и ухудшает течение энтерита бактериального генеза, вызванного *C. freundii*, у мышей [15]. Таким образом, одним из возможных механизмов индукции воспаления пищевым каррагинаном может являться его взаимодействие с люминальной микрофлорой, что приводит к усилению уже имеющегося воспаления кишечника.

Многочисленные исследования, подтверждающие способность каррагинанов вызывать воспаление в желудочно-кишечном тракте (ЖКТ) экспериментальных животных *in vivo* [4-7, 13], находятся в противоречии с результатами работ *in vitro*, в том числе и данного исследования, свидетельствующих о нетоксичности каррагинанов [9, 14, 15]. Данный факт указывает на комплексность эффектов каррагинанов в организме и обуславливает интерес к дальнейшим исследованиям, направленным на изучение механизмов токсического действия каррагинанов и патогенеза развития каррагинан-индуцированного воспаления ЖКТ.

Заключение

Краткосрочное воздействие высоких кон-

центраций полуочищенного каррагинана (пищевая добавка Е407а) на гранулоциты крови крыс не приводит к индукции апоптоза.

Литература

1. Campbell, R. Carrageenan industry market overview / R. Campbell, S. Hotchkiss // *Tropical Seaweed Farming Trends, Problems and Opportunities*. – 2017. – Vol. 9. – P. 193–205.
2. Cohen, S. M. A critical review of the toxicological effects of carrageenan and processed Eucheuma seaweed on the gastrointestinal tract / M. S. Cohen, N. Ito // *Crit. Rev. Toxicol.* – 2002 Sep. – Vol. 32, N 5. – P. 413–44.
3. Marine algae metabolites as promising therapeutics for the prevention and treatment of HIV/AIDS / N. N. Besednova [et al.] // *Metabolites*. – 2019 May. – Vol. 9, N 5. – pii: E87.
4. Revisiting the carrageenan controversy: do we really understand the digestive fate and safety of carrageenan in our foods? / S. David [et al.] // *Food Funct.* – 2018 Mar. – Vol. 9, N 3. – P. 1344–1352.
5. A study of enterocyte membranes during activation of apoptotic processes in chronic carrageenan-induced gastroenterocolitis / A. Tkachenko [et al.] // *Med. Glas. (Zenica)*. – 2018 Aug. – Vol. 15, N 2. – P. 87–92.
6. Martino, J. V. The role of carrageenan and carboxymethylcellulose in the development of intestinal inflammation / J. V. Martino, J. Van Limbergen, L. E. Cahill // *Front. Pediatr.* – 2017 May. – Vol. 5. – P. 96.
7. Damage and regeneration of small intestinal enterocytes under the influence of carrageenan induces chronic enteritis / G. I. Gubina-Vakyukyk [et al.] // *Comp. Clin. Pathol.* –

2015. – Vol. 24, N 6. – P. 1473–1477.
8. Clarifying the confusion between poligeenan, degraded carrageenan, and carrageenan: A review of the chemistry, nomenclature, and in vivo toxicology by the oral route / J. M. McKim [et al.] // *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.* – 2019. – Vol. 59. – P. 3054–3073.
9. Effects of carrageenan on cell permeability, cytotoxicity, and cytokine gene expression in human intestinal and hepatic cell lines / J. M. McKim [et al.] // *Food. Chem. Toxicol.* – 2016 Oct. – Vol. 96. – P. 1–10.
10. Carrageenan-induced inflammation promotes ROS generation and neutrophil extracellular trap formation in a mouse model of peritonitis / C.R. Barth [et al.] // *Eur. J. Immunol.* – 2016 Apr. – Vol. 46, N 4. – P. 964–970.
11. Geering, B. Peculiarities of cell death mechanisms in neutrophils / B. Geering, H. U. Simon // *Cell. Death. Differ.* – 2011 Sep. – Vol. 18, N 9. – P. 1457–1469.
12. Caspase-3 activation via mitochondria is required for long-term depression and AMPA receptor internalization / Z. Li [et al.] // *Cell.* – 2010 May. – Vol. 141, N 5. – P. 859–871.
13. Kopanytsia, O. M. Carrageenan induces cell death in rats blood / O. M. Kopanytsia, M. I. Marushchak, I. Y. Krynytska // *Int. J. Med. Med. Res.* – 2018. – Vol. 4, N 1. – P. 67–70.
14. Carrageenan primes leukocytes to enhance lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor alpha production / M. Ogata [et al.] // *Infect. Immun.* – 1999 Jul. – Vol. 67, N 7. – P. 3284–3289.
15. κ -Carrageenan enhances lipopolysaccharide-induced interleukin-8 secretion by stimulating the Bcl10-NF- κ B Pathway in HT-29 cells and aggravates C. freundii-induced inflammation in mice / W. Wu [et al.] // *Mediators Inflamm.* – 2017. – Vol. 2017. – P. 8634865.

Поступила 08.01.2020 г.

Принята в печать 25.03.2020 г.

References

1. Campbell R, Hotchkiss S. Carrageenan industry market overview. *Tropical Seaweed Farming Trends, Problems and Opportunities*. 2017;9:193-205.
2. Cohen SM, Ito N. A critical review of the toxicological effects of carrageenan and processed Eucheuma seaweed on the gastrointestinal tract. *Crit Rev Toxicol*. 2002 Sep;32(5):413-44. doi: 10.1080/20024091064282
3. Besednova NN, Zvyagintseva TN, Kuznetsova TA, Makarenkova ID, Smolina TP, Fedyanina LN, et al. Marine algae metabolites as promising therapeutics for the prevention and treatment of HIV/AIDS. *Metabolites*. 2019 May2;9(5). pii: E87. doi: 10.3390/metabo9050087.
4. David S, Shani Levi C, Fahoum L, Ungar Y, Meyron-Holtz EG, Shpigelman A, et al. Revisiting the carrageenan controversy: do we really understand the digestive fate and safety of carrageenan in our foods? *Food Funct*. 2018 Mar;9(3):1344-1352. doi: 10.1039/c7fo01721a
5. Tkachenko A, Marakushyn D, Kalashnyk I, Korniyenko Y, Onishchenko A, Gorbach T1, et al. A study of enterocyte membranes during activation of apoptotic processes in chronic carrageenan-induced gastroenterocolitis. *Med Glas (Zenica)*. 2018 Aug;15(2):87-92. doi: 10.17392/946-18
6. Martino JV, Van Limbergen J, Cahill LE. The role of

- carrageenan and carboxymethylcellulose in the development of intestinal inflammation. *Front Pediatr*. 2017 May;5:96. doi: 10.3389/fped.2017.00096
7. Gubina-Vakyukyk GI, Gorbach TV, Tkachenko A, Tkachenko MO. Damage and regeneration of small intestinal enterocytes under the influence of carrageenan induces chronic enteritis. *Comp Clin Pathol*. 2015;24(6):1473-7. doi: 10.1007/s00580-015-2102-3
8. McKim JM, Willoughby JA Sr, Blakemore WR, Weiner ML. Clarifying the confusion between poligeenan, degraded carrageenan, and carrageenan: A review of the chemistry, nomenclature, and in vivo toxicology by the oral route. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2019;59(19):3054-3073. doi: 10.1080/10408398.2018.1481822
9. McKim JM, Baas H, Rice GP, Willoughby JA Sr, Weiner ML, Blakemore W. Effects of carrageenan on cell permeability, cytotoxicity, and cytokine gene expression in human intestinal and hepatic cell lines. *Food Chem Toxicol*. 2016 Oct;96:1-10. doi: 10.1016/j.fct.2016.07.006
10. Barth CR, Funchal GA, Luft C, de Oliveira JR, Porto BN, Donadio MV. Carrageenan-induced inflammation promotes ROS generation and neutrophil extracellular trap formation in a mouse model of peritonitis. *Eur J Immunol*. 2016 Apr;46(4):964-70. doi: 10.1002/eji.201545520
11. Geering B, Simon U. Peculiarities of cell death mechanisms

- in neutrophils. *Cell Death Differ.* 2011 Sep;18(9):1457-69. doi: 10.1038/cdd.2011.75
12. Li Z, Jo J, Jia JM, Lo SC, Whitcomb DJ, Jiao S, et al. Caspase-3 activation via mitochondria is required for long-term depression and AMPA receptor internalization. *Cell.* 2010 May;141(5):859-71. doi: 10.1016/j.cell.2010.03.053
13. Kopanytsia OM, Marushchak MI, Krynytska IY. Carrageenan induces cell death in rats blood. *Int J Med Med Res.* 2018;4(1):67-70. doi: 10.11603/ijmmr.2413-6077.2018.1.8979
14. Ogata M, Matsui T, Kita T, Shigematsu A. Carrageenan primes leukocytes to enhance lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor alpha production. *Infect Immun.* 1999 Jul;67(7):3284-9.
15. Wu W, Zhen Z, Niu T, Zhu X, Gao Y, Yan J, et al. κ -Carrageenan enhances lipopolysaccharide-induced interleukin-8 secretion by stimulating the Bcl10-NF- κ B Pathway in HT-29 cells and aggravates *C. freundii*-induced inflammation in mice. *Mediators Inflamm.* 2017;2017:8634865 doi: 10.1155/2017/8634865

Submitted 08.01.2020

Accepted 25.03.2020

Сведения об авторах:

Ткаченко А.С. – к.м.н., доцент кафедры биологической химии, Харьковский национальный медицинский университет,

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1029-1636>.

Information about authors:

Tkachenko A.S. – Candidate of Medical Sciences, associate professor of the Chair of Biochemistry, Kharkiv National Medical University,

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1029-1636>.

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

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