

2. **Королюк М.А.** Метод определения активности каталазы / **М.А. Королюк, Л.И. Иванова, И.Г. Майорова, В.Е. Токарев** // Лабораторное дело. – 1988. – № 1. – С. 16-19.
3. **Моисеева Е.Г.** Метаболический гомеостаз и иммунная реактивность организма в динамике воспаления в тканях пародонта (экспериментальное исследование): автореф. дис. на соискание учёной степени доктора мед.наук: спец: 14.00.16 «Патологическая физиология» / **Е.Г. Моисеева**. – М., 2008. – 32 с.
4. **Спивак Н.Я.** Сепсис: иммунология и иммунокоррекция / **Н.Я. Спивак, С.М. Белоцкий, В.А. Карлов**. – К.: Фитосоциоцентр, 2007. – 304 с.
5. **Фомин В.В.** Функциональное состояние фагоцитарного, гуморального, клеточного звеньев иммунитета при стрептококковой инфекции / **В.В. Фомин, С. В. Пустынникова** // Уральский медицинский журнал. – 2007. – № 3. – С. 532-533.
6. **Хейфец Л.Б.** Разделение форменных элементов крови человека в градиенте плотности верографин-фиколл / **Л.Б. Хейфец, В.А. Абалакина** // Лабораторное дело. – 1973. – № 10. – С. 579-581.
7. **Чивари С.** Роль супероксиддисмутазы в окислительных процессах клетки и метод определения её в биологических материалах / **С. Чивари, И. Чаба, И. Секей** // Лабораторное дело. – 1985. – № 11. – С. 16-18.
8. **Foster T.J.** Immune evasion by staphylococci / **T.J. Foster** // Natural Reviews in Microbiology. – 2005. – № 3. – P. 948-958.
9. Pathophysiological role of Toll-like receptor 5 engagement by bacterial flagellin in colonic inflammation / **S.H. Rhee, E. Im, M. Riegler** [et al.] // Proceedings of National Academy of Sciences of the USA. – 2005. – № 38. – P. 13610-13615.
10. Peptidoglycan and lipoteichoic acid from *Staphylococcus aureus* induce tumor necrosis factor alpha, interleukin 6 (IL-6), and IL-10 production in both T cells and monocytes in a human whole blood model / **J.E. Wang, P.F. Jørgensen, M. Almlöf** [et al.] // Infection and Immunity. – 2006. – Volume 68. – P. 3965-3970.

УДК 577.114.4:612.015.11:616.33/.34-003.7-036.12-091.818-092.9

© Ткаченко А.С., Жуков В.И., Литвиненко Е.Ю., 2013.

## ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС И АКТИВНОСТЬ АПОПТОЗА ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ КАРРАГЕНАН-ИНДУЦИРОВАННОМ ГАСТРОЭНТЕРОКОЛИТЕ

**Ткаченко А.С., Жуков В.И., Литвиненко Е.Ю.**

*Харьковский национальный медицинский университет.*

**Ключевые слова:** гастроэнтероколит, каррагенан, перекисное окисление липидов, апоптоз, поли-(АДФ-рибоза)-полимераза, матриксная металлопротеиназа-2, каспаза-3.

**Ткаченко А.С., Жуков В.И., Литвиненко Е.Ю.** Окислявальний стрес та активність апоптозу при хронічному каррагенан-індукованому гастроентероколіті // Загальна патологія та патологічна фізіологія. – 2013. – Т. 8, № 1. – С. 74 – 79.

В експерименті на щурах вивчено показники перекисного окислення ліпідів (ПОЛ), антиоксидантної системи та активність ферментів, що беруть участь у процесі апоптозу в крові і гомогенаті кишечника щурів з хронічним каррагенан-індукованим гастроентероколітом (ГЕК). Встановлено, що дане захворювання супроводжується активацією ПОЛ, зниженням загальної антиоксидантної активності крові, що свідчить про розвиток оксидативного стресу. Хронічний каррагенан - індукований ГЕК також супроводжується активацією апоптичних процесів у кишечнику, на що вказує підвищення активності каспази-3, ММР-2 у крові і зниження активності ПАРП у гомогенаті кишечника.

**Ключові слова:** гастроентероколіт, каррагенан, перекисне окислення ліпідів, апоптоз, полі-(АДФ-рибоза)-полімераза, матриксна металлопротеїназа-2, каспаза-3.

**Tkachenko A., Zhukov V., Lytvynenko E.** Oxidative stress and activity of apoptosis in chronic carrageenan-induced gastroenterocolitis // Загальна патологія та патологічна фізіологія. – 2013. – Т. 8, № 1. – С. 74 – 79.

In recent years it has become widely recognized that the food additive carrageenan used in the food industry as a thickener and gelling agent contributes to the development of inflammatory diseases of the gastrointestinal tract. A model of chronic carrageenan-induced gastroenterocolitis of moderate severity has been elaborated, which allows studying carrageenan-induced intestinal inflammation. In particular, the state of lipid peroxidation/ antioxidant system is not studied in the development of chronic carrageenan-induced gastroenterocolitis. Since increased enterocyte apoptosis has been observed in several chronic diseases of the intestine, especially in Crohn's disease and

ulcerative colitis, it can contribute to the pathogenesis of chronic carrageenan-induced gastroenterocolitis. Lipid peroxidation, antioxidant system indices and the activity of enzymes involved in the process of apoptosis were studied in blood and intestinal homogenates of rats with chronic carrageenan-induced gastroenterocolitis. The female Wistar rats were used for the experiment. Chronic carrageenan-induced gastroenterocolitis was reproduced by the free access of animals to 1 % solution of carrageenan in drinking water.

Laboratory animals were divided into 3 groups. Group № 1 consisted of intact healthy animals. Group № 2 consisted of experimental animals, who consumed food additive carrageenan during 2 weeks and group № 3 included experimental animals, who consumed food additive carrageenan during 4 weeks. The development of gastroenterocolitis was proved morphologically and biochemically. Manipulations with animals were carried out in accordance with the provisions of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes (Strasbourg, 1986).

It was established that the disease was associated with activation of lipid peroxidation, decreased total antioxidant activity of blood, indicating the development of oxidative stress. Chronic carrageenan-induced gastroenterocolitis was also accompanied by activation of apoptotic processes in intestine, as indicated by increased activity of caspase-3, MMP-2 in blood and reduced activity of PARP in the intestinal homogenates. Obtained data allow us to presume that activation of lipid peroxidation with insufficiency of antioxidant activity, observed after consumption of carrageenan, indicates the development of oxidative stress. Development of carrageenan-induced gastroenterocolitis is accompanied by caspase-3 activation and MMP-2 activation, suggesting a significant role of apoptosis in enterocytes damage. Reduced activity of PARP together with increased activity of MMP-2 and caspase-3 might be the result of secondary necrosis in experimental animals.

**Keywords:** gastroenterocolitis, carrageenan, lipid peroxidation, apoptosis, PARP, caspase-3, MMP-2.

Результаты, представленные в статье, получены в ходе выполнения НИР «Вивчення віддалених наслідків регулярного споживання харчових продуктів, що містять генетично модифіковані організми, в умовах пошкодження епітеліального бар'єру шлунково-кишкового тракту» (номер государственной регистрации 0110U000653).

**Введение.** В настоящее время на Украине заболевания пищеварительного тракта (ПТ) занимают 3-е место (9,3 %) в структуре распространенности среди всех заболеваний [5]. Рост числа хронических воспалительных заболеваний кишечника [3] может быть обусловлен изменением характера питания населения, в том числе употреблением различных пищевых добавок. Многочисленные исследования, проводившиеся за последние годы, указывают на то, что пищевая добавка каррагенан, употребляемая в пищевой промышленности в качестве загустителя и гелеобразователя, вносит существенный вклад в развитие воспалительных заболеваний ПТ [12, 18]. Несмотря на разработанную модель хронического каррагенанового гастроэнтероколита (ГЭК) средней степени тяжести, без язвенно-некротического процесса, путем использования низких доз каррагенана [4] и изучение особенностей каррагенанового воспаления в кишечнике [17], механизмы

развития данного заболевания остаются невыясненными. В частности не изучено состояние системы перекисного окисления липидов (ПОЛ)/антиоксидантной защиты (АОЗ) при развитии хронического каррагенан-индуцированного гастроэнтероколита.

Во многих работах подчеркивается роль активных форм кислорода (АФК) в качестве важных регуляторов клеточных процессов и ключевых элементов изменения программ дифференцировки, пролиферации и апоптоза клеток [7, 8, 16]. При наличии в организме любых патологических процессов одним из наиболее значимых интегральных показателей состояния метаболизма является интенсивность свободнорадикальных процессов, и, прежде всего, перекисного окисления липидов (ПОЛ). Окислительный стресс, дисбаланс между прооксидантами и антиоксидантами, играет ключевую роль в патофизиологии целого ряда различных заболеваний. Основным параметром оценки наличия окислительного стресса является накопление первичных и вторичных продуктов свободнорадикального окисления. В силу стабильности продукты перекисного окисления полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК), включая диеновые конъюгаты ПНЖК (ДК) и основной продукт реакции с тиобарбитуровой кислотой – малоно-

вый диальдегид (МДА), являются наиболее информативными показателями наличия окислительного стресса [1]. Окислительный стресс запускает патологические реакции, необратимо повреждающие клетку и приводящие к запуску генетически запрограммированной гибели – апоптозу.

Известно, что апоптоз энтероцитов является одним из ключевых факторов патогенеза хронических заболеваний кишечника, в частности болезни Крона и язвенного колита [11], однако роль апоптоза энтероцитов в развитии хронического каррагенан-индуцированного ГЭЖ, а также влияние на апоптоз окислительного стресса и ферментов поли-(АДФ-рибоза)-полимеразы (ПАРП), матриксной металлопротеиназы-2 (ММП-2) и каспазы-3 не изучены.

**Целью** работы явилось изучение уровня ПОЛ, состояния антиоксидантной системы и активности апоптических процессов у крыс с экспериментальным хроническим каррагенан-индуцированным гастроэнтероколитом.

**Материалы и методы.** Эксперимент проводили на половозрелых крысах-самках линии Вистар, содержащихся в стандартных условиях вивария. Животные были разделены на 3 группы. Контрольная группа состояла из интактных здоровых животных. Вторая группа - из животных, принимавших пищевую добавку каррагенан в течение 2 недель. Третья группа включала в себя крыс, которые употребляли каррагенан в течение 4 недель. Моделирование заболевания осуществлялось путем свободного доступа экспериментальных животных к 1 % раствору каррагенана в питьевой воде [4]. Развитие гастроэнтероколита через две недели после начала приема каррагенана подтверждено морфологически и биохимически. Содержание животных и манипуляции над ними проводили в соответствии с положениями Европейской конвенции «О защите позвоночных животных, которые используются для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986).

Концентрацию малонового диальдегида в сыворотке крови определяли спектрофотометрическим методом по Федоровой Т.К. и соавт. [6], а диеновых конъюгатов по Гаврилову Б.В. и соавт. [2]. Общую антиоксидантную активность (ОАА) сыворотки крови определяли спектрофотометрически. Активность ПАРП определяли по методу, основанному на электрофоретическом отделении поли-АДФ-рибозилированных гистоновых белков из ядер с последующим количественным определением в них поли-АДФ-рибозы [19]. Активность каспазы-3 определяли иммуноферментным методом с помощью набора реактивов фирмы «eBioscience» (Вена, Австрия). Активность ММП-2 в сыворотке крови определяли иммуноферментным методом с помощью набора реактивов фирмы «Quantikine» (Миннеаполис, США). Статистическую обработку цифровых данных проводили с помощью пакетов программы GraphPad Prism 5. Для выявления различий между независимыми группами нормально распределенных величин использовали t-критерий Стьюдента-Фишера; различия между группами считали статистически достоверными при  $p \leq 0,05$ .

**Результаты и их обсуждение.** Установлено, что у животных, употреблявших каррагенан, в сыворотке крови повышаются уровни как МДА, так и ДК по сравнению с животными контрольной группы. При этом более выраженные изменения данных показателей ПОЛ характерны для двухнедельного приема каррагенана.

Проведенные нами исследования показали, что уровень МДА через две недели приема каррагенана в крови экспериментальных животных в 4 раза превышает показатели контрольной группы, а при четырехнедельном употреблении данной пищевой добавки - в 2,5 раза. Схожая динамика изменений характерна и для концентрации ДК в крови крыс с хроническим ГЭЖ. Двухнедельное употребление каррагенана приводит к повышению уровня ДК в крови экспериментальных животных в 2,6 раза.

При дальнейшем развитии заболевания уровень ДК снижается, не дости-

гая, однако показателей контрольной группы (таблица 1).

**Таблица 1.** Показатели перекисного окисления липидов в крови экспериментальных животных

Группы животных	Малоновый диальдегид (мкМ/г белка)	Диеновые конъюгаты (мкМ/г белка)
Контрольная (n=10)	1,640±0,03754	39,64±0,4207
Гастроэнтероколит 2 недели (n=10)	6,470±0,1555 p<0,0001	103,2±1,872 p<0,0001
Гастроэнтероколит 4 недели (n=10)	3,820±0,04477 p<0,0001	64,71±1,173 p<0,0001

Подобные результаты свидетельствуют об активации свободнорадикальных процессов и процессов липидной перекисидации при каррагенан-индуцированном гастроэнтероколите. При этом более выраженные изменения характерны для более ранних стадий хронического каррагенан-индуцированного интестинального воспаления.

Для оценки состояния антиоксидантной системы был выбран показатель общей антиоксидантной активности сыворотки крови. Установлено, что двухне-

дельный прием каррагенана не приводит к достоверным изменениям показателя ОАА. Однако, показатель ОАА у экспериментальных животных, употреблявших каррагенан в течение 4 недель, снижен в 2,6 раза по сравнению с аналогичным показателем крыс контрольной группы (таблица 2), что свидетельствует о подавлении антиоксидантной системы и, в сочетании с активацией ПОЛ, позволяет сделать вывод о развитии оксидативного стресса при хроническом каррагенан-индуцированном ГЭК.

**Таблица 2.** Показатели общей антиоксидантной активности крови экспериментальных животных

Группы животных	Общая антиоксидантная активность (ед/мл)
Контрольная (n=10)	1,851±0,02511
Гастроэнтероколит 2 недели (n=10)	1,876±0,02894 p=0,5381
Гастроэнтероколит 4 недели (n=10)	0,7086±0,04564 p<0,0001

Для оценки состояния апоптических процессов определяли активность каспазы-3 и ММР-2 в сыворотке крови животных, а также активность ПАРП в гомогенате тонкой кишки.

Центральным звеном в механизме апоптоза является протеолитическая система, включающая семейство белков, называемых каспазами. Каспазы принадлежат к классу цистеиновых протеаз [10] Каспаза-3 принимает участие как в апоптозе, активированном по внешнему пути (рецепторы клеточной смерти), так и по внутреннему пути (митохондриальному) [18]. В ходе проведенного исследования

установлено, что систематическое употребление каррагенана приводит к значительному повышению активности каспазы-3 в сыворотке крови. Активность каспазы-3 у животных 2-ой группы повышена в 8,3 раза по сравнению с лабораторными животными контрольной группы, а у животных из 3-ей группы – в 38,3 раза (таблица 3). Выявленные изменения активности фермента, обусловленные приемом каррагенана, при наличии оксидативного стресса можно рассматривать как активацию апоптоза, индуцированную генерацией АФК.

Таблиця 3. Показатели апоптоза у експериментальних тварин

Групи тварин	Каспаза-3 (нг/мл)	Поли(АДФ)-рибоза-полімераза (мкмоль/мг білка)	Матриксная металло-протеїназа-2 (нг/мл)
Контрольна (n=10)	0,9017±0,1049	1,370±0,02171	7,287±0,2101
Гастроентероколіт 2 тижні (n=10)	7,519±0,4851 p<0,0001	-	22,81±1,212 p<0,0001
Гастроентероколіт 4 тижні (n=10)	34,57±1,636 p<0,0001	0,46±0,01558 p<0,0001	11,43±0,3252 p<0,0001

Поли (АДФ-рибоза)-полімеразы - ферменти, каталізуючі полі-АДФ-рибозилірованіє, один из видів посттрансляційної модифікації білків. ПАРП вовлечена в три специфічних шляхи репарації ДНК: ексцизійна репарація ДНК шляхом видалення пошкоджених азотистих основань (BER), SSB-репарація і DSB-репарація [13]. ПАРП виступає в ролі сенсора пошкодження ДНК, а також передає сигнал на білки-ефектори, наприклад ДНК-лігазу 3 і β-ДНК-полімеразу [15].

Установлено, що розвиток каррагенан-індуційованого ГЭК супроводжується різким зниженням активності ПАРП в клітках кишечника у тварин, що вживали каррагенан впродовж 4 тижнів, у яких рівень активності ПАРП в гомогенаті тонкої кишки достовірно знижений в 3 рази. По даним літератури відомо, що деградація ПАРП здійснюється, в тому числі, і під впливом каспазы-3 [9].

Обнаруженное повышение активности каспазы-3 может объяснить снижение активности ПАРП, вследствие активного протеолиза и деградации ПАРП под действием каспазы-3, что приводит к нарушению репарации ДНК и, как следствие, гибели клетки при активации апоптотических процессов.

Биологическим смыслом инактивации ПАРП является предотвращение израсходования НАД (субстрата ПАРП) и АТФ, которые необходимы на дальнейших стадиях апоптоза. Апоптоз может сопровождаться и вторичным некрозом, что приводит к потере белков, в том числе и ПАРП.

Помимо каспазы-3 ПАРП расщепляется и инактивируется под действием MMP-2, также известной как желатиназа А или коллагеназа IV типа, и являющейся наиболее экспрессируемой матричной металлопротеиназой, встречающаяся практически во всех тканях и клетках [14]. Прием пищевой добавки каррагенан в течение 2 недель приводит к повышению активности MMP-2 в сыворотке крови экспериментальных животных в 3 раза, а при 4-х недельном употреблении - в 1,5 раза по сравнению с лабораторными животными контрольной группы (табл. 3).

Снижение активности ПАРП в гомогенате кишечника, при повышении активности каспазы-3 и MMP-2 в крови крыс с хроническим каррагенановым интестинальным воспалением, указывают на активацию апоптотических процессов и, возможно, вторичного некроза у экспериментальных животных.

**Выводы:** 1) Активация ПОЛ при недостаточности АОС, отмечаемая при приеме пищевой добавки каррагенан, свидетельствует о развитии окислительного стресса, обуславливающего повреждение энтероцитов. 2) Развитие каррагенан-индуційованого ГЭК супроводжується активацією каспазы-3 і MMP-2, що свідчить про значительную роль апоптоза в механізмі пошкодження ентероцитів. 3) Зниження активності ПАРП при збільшенні MMP-2 і каспазы-3 може бути результатом розвитку вторичного некроза у експериментальних тварин.

**Перспективи дальніших досліджень.** Отримані нами дані обґрунтовують перспективу дальніших

исследований, направленных на изучение влияния пищевой добавки каррагенан на пищеварительный тракт эксперименталь-

ных животных с целью предупреждения его негативного влияния на здоровье людей.

ЛИТЕРАТУРА:

1. **Аджиев Д.Д.** Исследование продуктов перекисного окисления липидов неферментативной и ферментативной антиоксидантной системы в возрастной динамике самцов кроликов / **Д.Д. Аджиев** // Вестник ВОГиС. - 2010. - Т. 14, № 4. - С. 674-684.
2. **Гаврилов Б.В.** СФ-метрическое определение содержания ГПЛ в плазме крови / **Б.В. Гаврилов, М.И. Мишкорудная** // Лаб. дело. - 1983. - № 3. - С. 33-36.
3. **Загорский С.Э.** Хронические воспалительные заболевания у детей и подростков (современный подход) / **С.Э. Загорский, Л.М. Беляева** // Минск: БелМАПО. - 2007. - С. 4-28.
4. Патент на изобретение № 97322 от 25.01.12 «Спосіб моделювання хронічного гастроентероколіту»
5. **Ткач С.М.** Настоящее и будущее гастроэнтерологии / **С.М. Ткач** // Здоров'я України. - 2008. - С. 33-34.
6. **Федорова Т.К.** Реакция с ТБК для определения МДА крови методом флюометрии / **Т.К. Федорова, Т.С. Коршунова, Э.Т. Ларская** // Лаб. дело. - 1983. - № 3. - С. 25-28.
7. **Франциенц Е. М.** Перекисное окисление липидов в патогенезе заболеваний / **Е.М. Франциенц, Ю.С. Сидоренко, Л.Я. Розенко** / Ростов-на-Дону: Изд. Ростовского университета, 2005. - 175 с.
8. **Цепалов В.Ф.** Исследование синтетических и природных антиоксидантов in vivo и in vitro / **В.Ф. Цепалов** // Исследование синтетических и природных антиоксидантов in vivo и in vitro Москва, 1992 - С. 16-26.
9. **Boulares A.H.** Role of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) cleavage in apoptosis. Caspase 3-resistant PARP mutant increases rates of apoptosis in transfected cells / **A.H. Boulares, A.G. Yakovlev, V. Ivanova [et al.]** // J. Biol. Chem. - 1999. - Vol. 274, № 33. - P. 22932-22940.
10. **Chinnaiyan A.M.** The cell-death machine. / **A.M. Chinnaiyan, V.M. Dixit** // Curr. Biol. - 1996. - Vol. 6. - P. 555-562.
11. **Di Sabatino A.** Increased enterocyte apoptosis in inflamed areas of Crohn's disease / **A. Di Sabatino, R. Ciccocioppo, O. Luinetti [et al.]** // Dis. Colon. Rectum. - 2003. - Vol. 46, № 11. - P. 1498-1507.
12. **Kitano A.** Distribution and antiinflammatory effect of mesalazine on carrageenan-induced colitis in the rabbit / **A. Kitano, T. Matsumoto, N. Oshitani [et al.]** // Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. - 1996. - Vol. 23. - P. 305-309.
13. **Krishnakumar R.** The PARP side of the nucleus: molecular actions, physiological outcomes, and clinical targets / **R. Krishnakumar, W.L. Kraus** // Molecular Cell. - 2010. - Vol. 39. - P. 8-24.
14. **Kwan J.A.** Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) is present in the nucleus of cardiac myocytes and is capable of cleaving poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) in vitro / **J.A. Kwan, C.J. Schulze, W. Wang [et al.]** // FASEB J. - 2004. - Vol. 18. - P. 690-692.
15. **Maxim I.** Investigation of PARP-1, PARP-2, and PARG interactomes by affinity-purification mass spectrometry / **I. Maxim, X. Moreel, J.-P. Gagné [et al.]** // Proteome Sci. - 2010. - Vol. 8. - P. 22.
16. **Minuk G.Y.** Effect of amino acids on luminol-dependent chemiluminescence generated by peripheral blood polymorphonuclear leukocytes / **G.Y. Minuk, N. Rascanin, D.E. Woods** // J. Clin. Microbiol. - 1986. - Vol. 24. - P. 307-309.
17. **Pricolo V.E.** Effects of lambda-carrageenan induced experimental enterocolitis on splenocyte function and nitric oxide production / **V.E. Pricolo, S.M. Madhere, S.D. Finkelstein** // J. Surg. Res. - 1996. - Vol. 66, № 1. - P. 6-11.
18. **Salvesen G.S.** Caspases: opening the boxes and interpreting the arrows / **G.S. Salvesen** // Cell Death Differ. - 2002. - Vol. 9, № 1. - P. 3-5.
19. **Sumbayev V.V.** / **V.V. Sumbayev, I.M. Yasinska, A.Y. Kosanov** // Biochem. Soc. Trans. - 2000. - Vol. 28, № 5. - P. 335.