

DOI: 10.26693/jmbs02.04.036

УДК 616.212/.216-002.2/.3-078:57.083.3:612.017.1

Ткаченко А. С., Гопкалов В. Г.

## ДИНАМІКА ВМІСТУ ФРАКТАЛКІНУ У СИРОВАТЦІ КРОВІ ЩУРІВ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ ГАСТРОЕНТЕРОКОЛІТІ

Харківський національний медичний університет, м. Харків

antontkachenko555@gmail.com

В експерименті показано, що розвиток гастроентероколіту, який викликається пероральним вживанням желеутворювача та емульгатора карагенану, супроводжується підвищенням вмісту хеоміну фракталкіну в сироватці крові. Встановлено, що вміст сироваткового фракталкіну у 1,5 рази підвищується при двотижневому прийомі карагенану та у 5,5 разів - при чотирьохтижневому. Таким чином, карагенан бере участь у хронізації карагенан-індукованого запалення шляхом рекрутування нових моноцитів та цитотоксичних клітин.

**Ключові слова:** карагенан, гастроентероколіт, хронічне запалення, фракталкін, хеоміни.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Результати, що висвітлюються у статті, були отримані у ході проведення НДР «Вивчення віддалених наслідків регулярного споживання харчових продуктів, що містять генетично модифіковані організми, в умовах пошкодження епітеліального бар'єру шлунково-кишкового тракту», № державної реєстрації 0110 U000653.

**Вступ.** Дослідження останніх років підтверджують, що представники сімейства хеомінів грають роль провідних модуляторів міграції клітин імунної системи, а також вносять важливий вклад у різноманітні фізіологічні та патологічні процеси, у тому числі ембріогенез, розвиток імунної системи і забезпечення її адекватного функціонування, запалення, утворення пухлин та метастазування [6]. Незважаючи на те, що хеоміни спочатку були ідентифіковані як важливі медіатори гострого запалення, на даний момент відомо, що хеомінова система, яка являє собою сукупність приблизно 50 ендогенних низькомолекулярних білків (8-11 кДа) та 20 G-білокспряжених трансмембранних сигнальних рецепторів, також має ключове значення для генерації первинних та вторинних адаптивних клітинних і гуморальних імунних реакцій. Нещодавні роботи демонструють залучення хеомінів у диференціювання незрілих Т-клітин [7]. Хронічні запальні захворювання характеризуються тривалою лейкоцитарною інфільтрацією у місці запалення, що

значною мірою обумовлено надлишковою продукцією хеомінів [9]. Саме здатність хеомінів викликати хімічну атракцію імунних клітин обумовлює інтерес наукової спільноти до вивчення особливостей хеомінової системи при різноманітних патологічних процесах.

Фракталкін, також відомий як CX3CL1, є єдиним представником четвертого класу хеомінів і опосередковує як хемотаксис, так і адгезію запальних клітин через високоселективний рецептор CX3CR1 [4]. У даний час недостатньо вивчена роль CX3CL1 у прогресуванні інтестинального запалення.

**Метою роботи** було вивчити вміст сироваткового фракталкіну в динаміці розвитку хронічного карагенан-індукованого гастроентероколіту у щурів.

**Матеріали та методи досліджень.** Експеримент проводили на тридцяти білих статевозрілих щурах-самках популяції WAG, які перебували у стандартних умовах віварію ХНМУ. У ході дослідження тварин у випадковому порядку розподілили на 3 групи. Кожна група щурів складалася з десяти особин. Тварини першої та другої групи отримували щоденно перорально 1% розчин  $\lambda$ -карагенану протягом 2-х тижнів та 4-х тижнів відповідно. Карагенани – це желеутворюючі речовини, що виділяються водною екстракцією з водоростей *Chondrus crispus*, і являють собою сімейство сульфатованих гідроколлаїдів, полімерний ланцюг яких побудований із залишків галактози та її похідних з  $\alpha$ -1,3 - і  $\beta$ -1,4 -глікозидними зв'язками, що чергуються [2]. Вживання даної речовини призводило до розвитку хронічного гастроентероколіту у тварин обох груп. Розвиток захворювання підтверджено морфологічно [1, 3, 8]. Третя група була контрольною і включала інтактних тварин, що не вживали харчову добавку карагенан.

Експеримент проводили відповідно до «Спільних етичних принципів проведення експериментів на тваринах», що прийняті Першим Національним конгресом з біоетики (Київ, Україна, 2001), VIII Директивою 2010/63/EU Європейського

парламенту і Ради Європейського Союзу від 22.09.2010 р. з охорони тварин, що використовуються у наукових цілях, і положеннями Європейської конвенції «Про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986). Етичні аспекти дослідження не викликали нарікань з боку комісії з біоетики ХНМУ.

Лабораторних тварин виводили з експерименту шляхом декапітації під тіопенталовим наркозом (50 мг/кг маси тіла). Після виведення з експерименту з крові тварин отримували сироватку шляхом центрифугування. Вміст хемокину фракталкіну визначали методом імуноферментного аналізу з використанням набору реактивів фірми «RayBiotech» (США). Порядок підготовки проб, реагентів і безпосередньо вимірювання виконували згідно з інструкцією виробника тест-систем. Для реєстрації оптичної щільності отриманих розчинів використовували імуноферментний аналізатор «Awareness Technology Stat Fax 303 Plus Microstrip Reader».

Статистичну обробку даних проводили за допомогою пакетів програми «GraphPad Prism 5». Для оцінки відмінностей кількісних ознак між незалежними групами використовувався критерій Манна-Уїтні. Відмінності цифрових показників вважали статистично значущими при  $p < 0,05$ . Числові значення представлені у вигляді медіани (Me) та інтерквартильного розмаху (25%; 75%).

#### Результати дослідження та їх обговорення.

У ході дослідження встановлено, що у тварин, які вживали харчову добавку карагенан протягом двох тижнів, вміст фракталкіну у сироватці крові був статистично достовірно ( $p < 0,01$ ) підвищеним у 1,5 рази у порівнянні з контрольною групою. Концентрація фракталкіну у контролі складала 14,34 (13,37; 15,41) пг/мл, а у щурів першої групи вміст CX3CL1 у сироватці досягав 25,48 (23,73; 28,61) пг/мл (рис. 1).

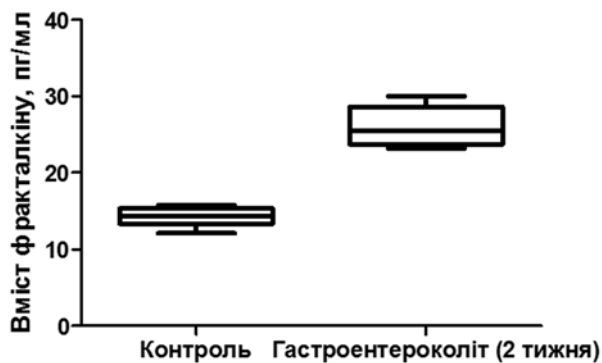


Рис. 1. Вміст фракталкіну у сироватці крові щурів з гастроентероколітом, що викликаний двотижневим вживанням карагенану

Встановлено, що при подальшому прогресуванні захворювання вміст сироваткового фракталкіну підвищується більш виражено (рис. 2). У тварин другої групи після вживання карагенану протягом 1 місяця концентрація сироваткового хемокину CX3CL1 досягала 82,11 (51,97; 87,68) пг/мл, що статистично достовірно ( $p < 0,01$ ) перевищувало аналогічний показник щурів контрольної групи більш ніж у 5,5 разів.

Відомо, що вісь CX3CL1/CX3CR1 у першу чергу задіяна у промоції хемотаксису та адгезії NK-клітин, CD14<sup>+</sup> моноцитів, а також цитотоксичних ефektorних Т-клітин [5]. Таким чином, ми можемо допустити, що роль фракталкіну при хронічному карагенан-індукованому гастроентероколіті полягає у залученні нових моноцитів та цитотоксичних клітин у зону запалення. Динаміка змін вмісту даного цитокину у сироватці крові щурів при розвитку хронічного карагенан-індукованого гастроентероколіту свідчить про значущу роль CX3CL1 у прогресуванні захворювання і підтриманні інтенсивності запального процесу шляхом залучення нових імунних клітин. Окрім хемотаксисних властивостей, фракталкін також здатен стимулювати фібробласти [4, 5]. Таким чином, ми вважаємо, що направлена міграція фібробластів під дією CX3CL1 до зони запалення призводить до активації синтезу колагену та проліферації позаклітинного матриксу, що є характерною ознакою запалення.

Краще розуміння імунологічних процесів, що регулюються цитокінами та хемокінами, зокрема фракталкіном, необхідно для розробки нових терапевтичних підходів до лікування хронічних запальних захворювань шлунково-кишкового тракту. Використання інгібіторів фракталкіну може бути обґрунтоване для зниження інтенсивності запального процесу та перешкоджання переходу гострого інтестинального запалення у хронічну форму за рахунок зниження хемотаксису клітин імунної системи та інгібування міграції фібробластів.



Рис. 2. Вміст фракталкіну у сироватці крові щурів з гастроентероколітом, що викликаний чотирьохтижневим вживанням карагенану

## Висновки

1. Хронічний експериментальний карагенан-індукований гастроентероколіт у щурів супроводжується підвищенням вмісту хемокину фракталкіну у сироватці крові.
2. При прогресуванні захворювання вміст фракталкіну підвищується більш виражено: у 5,5 разів через 4 тижня вживання карагенану у порівнянні з підвищенням у 1,5 рази при двотижневому вживанні цієї харчової добавки.

3. Фракталкін впливає на розвиток хронічного карагенан-індукованого гастроентероколіту шляхом активації таксису цитотоксичних Т-клітин та моноцитів.

**Перспективи подальших досліджень.** Отримані нами дані обґрунтовують перспективу подальших досліджень, спрямованих на вивчення особливостей хемокинового спектру при запальних захворюваннях шлунково-кишкового тракту.

## References

1. Gubina-Vakulik GI, Tkachenko AS, Orlova MA. Morphological condition of the small intestine after prolonged intake of food additive carrageenan. *Bulletin of problems of biology and medicine*. 2014;3 (109), 2: 252-6. [Russian].
2. Yermak IM, Byankina (Barabanova) AO, Sokolova EV. Structural peculiarities and biological activity of carrageenans – sulphated polysaccharides from red algae collected from the Russian Pacific coast. *Vestnik of the Far East Branch of the Russian Academy of Sciences*. 2014; 1 (173): 80-92. [Russian].
3. Patent 97322 Ukraine, G09B 23/28. The way of modeling chronic gastroenterocolitis / Ivanenko TO, Korobchanski VO, Gubina-Vakyulyk GI, Gorbach TV, Kolousova NG; applicant Kharkiv national medical university. № a201014510. [Ukrainian].
4. D'Haese JG, Demir IE, Friess H, Ceyhan GO. Fractalkine/CX3CR1: why a single chemokine-receptor duo bears a major and unique therapeutic potential. *Expert Opin Ther Targets*. 2010; 14 (2): 207-19. PMID: 20055718. DOI: 10.1517/14728220903540265.
5. Ferretti E, Pistoia V, Corcione A. Role of fractalkine/CX3CL1 and its receptor in the pathogenesis of inflammatory and malignant diseases with emphasis on B cell malignancies. *Mediators of inflammation*. 2014; Article ID 480941. 10 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/480941>.
6. Gerard C, Rollins BJ. Chemokines and disease. *Nat Immunol*. 2001; 2: 108–15. PMID: 11175802. DOI: 10.1038/84209.
7. Griffith JW, Sokol CL, Luster AD. Chemokines and chemokine receptors: positioning cells for host defense and immunity. *Annu Rev Immunol*. 2014; 32: 659-702. PMID: 24655300. DOI: 10.1146/annurev-immunol-032713-120145.
8. Gubina-Vakyulyk GI, Tkachenko AS, Gorbach TV, Tkachenko MO. Damage and regeneration of small intestinal enterocytes under the influence of carrageenan induces chronic enteritis. *Comparative Clinical Pathology*. 2015; 24 (6): 1473-7. DOI: 10.1007/s00580-015-2102-3.
9. White GE, Iqbal AJ, Greaves DR. CC chemokine receptors and chronic inflammation--therapeutic opportunities and pharmacological challenges. *Pharmacol Rev*. 2013; 65 (1): 47-89. PMID: 23300131. DOI: 10.1124/pr.111.005074.

УДК 616.212/.216-002.2/.3-078:57.083.3:612.017.1

## ДИНАМИКА СОДЕРЖАНИЯ ФРАКТАЛКИНА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ КРЫС ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ГАСТРОЭНТЕРОКОЛИТЕ

Ткаченко А. С., Гопкалов В. Г.

**Резюме.** В эксперименте показано, что развитие гастроэнтероколита, который вызывается пероральным употреблением гелеобразователя и эмульгатора каррагинана, сопровождается повышением содержания хемокина фракталкина в сыворотке крови. Установлено, что концентрация сывороточного фракталкина в 1,5 раза повышается при двухнедельном приеме каррагинана и в 5,5 раза - при четырехнедельном. Таким образом, каррагинан участвует в хронизации каррагинан-индуцированного воспаления путем рекрутирования новых моноцитов и цитотоксических клеток.

**Ключевые слова:** каррагинан, гастроэнтероколит, хроническое воспаление, фракталкин, хемокины.

UDC 616.212/.216-002.2/.3-078:57.083.3:612.017.1

## Dynamics of the Blood Serum Fractalkine Content in Experimental Gastroenterocolitis

Tkachenko A., Gopkalov V.

**Abstract.** Recent studies have demonstrated that members of the chemokine family play a pivotal role in modulating migration of immune cells. They also contribute to various physiological and pathological processes, including embryogenesis, immune system development, inflammation, tumor formation and metastasis. Chronic inflammatory diseases are characterized by leukocyte infiltration at the site of inflammation due to excessive production of chemokines. The ability of chemokines to induce a chemical attraction of immune cells explains the interest of researchers to the investigation of the chemokine system characteristics in various pathological

processes. Fractalkine or CX3CL1 is a chemokine that promotes chemotaxis and adhesion of inflammatory cells via its highly selective receptor CX3CR1. Nowadays, the role of CX3CL1 in the progression of intestinal inflammation is poorly understood.

*The aim* of the research is to study serum fractalkine levels in the dynamics of development of carrageenan-induced chronic gastroenterocolitis in rats.

*Materials and methods.* The experiment was carried out on thirty white WAG rats. They were randomly divided into 3 groups. Each group consisted of ten rats. Animals of group 1 and group 2 received 1%  $\lambda$ -carrageenan solution daily orally for 2 weeks and 4 weeks, respectively. Carrageenan is a gelling substance produced by water extraction from algae *Chondrus crispus*. This heteropolysaccharide is used as a food additive. Oral exposure to carrageenan led to chronic gastroenterocolitis in animals from both group 1 and group 2. The third group consisted of intact animals.

The fractalkine content in blood serum was determined by ELISA. To register the optical density of solutions, the *Awareness Technology Stat Fax 303 Plus Microstrip Reader* was used. The data obtained in the research were statistically processed using the Graph Pad Prism 5 application.

*Results and discussion.* It was found out that the fractalkine content in serum of the animals from group 1 was significantly 1.5 times higher compared to the control group. Its concentration in the control group was 14.34 (13.37; 15.41) pg/ml, whereas its serum level in the rats of group 1 reached 25.48 (23.73; 28.61) pg/ml. The progression of the disease was associated with more pronounced elevated fractalkine concentrations. In animals from group 2 the serum concentration of fractalkine reached 82.11 (51.97; 87.68) pg/ml which was 5.5-fold higher than in the control group. The role of fractalkine in chronic carrageenan-induced gastroenterocolitis most likely involves the recruitment of new monocytes and cytotoxic cells to the inflammation area. The dynamics of changes in the content of this cytokine in blood serum of rats during the development of chronic carrageenan-induced gastroenterocolitis indicates a significant role of CX3CL1 in disease progressing and maintaining the intensity of the inflammatory process by recruiting new immune cells.

*Conclusions.* Chronic carrageenan-induced gastroenterocolitis is accompanied by the increased blood serum level of fractalkine, which increases with the progression of the disease. Fractalkine is involved in the progression of chronic carrageenan-induced gastroenterocolitis by activating chemotaxis of cytotoxic T-cells and monocytes.

**Keywords:** carrageenan, gastroenterocolitis, chronic inflammation, fractalkine, chemokines.

Стаття надійшла 27.08.2017 р.

Рекомендована до друку на засіданні редакційної колегії після рецензування