

А. С. Ткаченко, В. И. Жуков, Т. В. Горбач, И. М. Васильева, М. А. Ткаченко
Харьковский национальный медицинский университет

СОДЕРЖАНИЕ МАТРИКСНОЙ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ-9 И ФНО- α В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ПРИ УПОТРЕБЛЕНИИ ПИЩЕВОЙ ДОБАВКИ E407

Актуальность. В настоящее время отмечается тенденция роста распространенности хронических воспалительных заболеваний кишечника – болезни Крона и неспецифического язвенного колита. Одной из возможных причин может служить потребление различных пищевых добавок, а именно загустителя E407 (каррагинан), который способен вызывать воспаление кишечника в эксперименте при длительном употреблении.

Цель исследования. Изучение уровня провоспалительного цитокина ФНО- α и матриксной металлопротеиназы-9 (ММП-9), а также анализ их возможной взаимосвязи, при E407-индуцированном гастроэнтероколите.

Лабораторные животные были разделены на три группы: контрольная группа ($n = 10$), двухнедельное употребление E407 ($n = 10$), четырехнедельное употребление E407 ($n = 10$). Пероральный прием E407 приводил к развитию гастроэнтероколита. Уровень ФНО- α и ММП-9 определяли в сыворотке крови иммуноферментным методом.

Установлено, выраженное достоверное повышение как ФНО- α , так и ММП-9 при приеме каррагинана. Обнаружено наличие положительной средней корреляционной связи между изученными показателями при приеме E407.

Таким образом, положительная корреляция между ФНО- α и ММП-9 позволяет предположить наличие стимулирующего влияния ФНО- на экспрессию ММП-9 и потенциальную роль ММП-9 в ФНО- α -зависимом ремоделировании соединительной ткани. Мы предполагаем, что JNK киназа вовлечена в ФНО- α зависимую активацию ММП-9.

Ключевые слова: гастроэнтероколит, каррагинан, хроническое воспаление, ФНО- α , матриксная металлопротеиназа-9.

В последние годы гастроэнтерологи отмечают существенный рост распространенности хронических воспалительных заболеваний кишечника, таких как болезнь Крона (БК) и неспецифический язвенный колит (НЯК) [1, 2]. Характерной тенденцией является положительная корреляция между заболеваемостью БК, НЯК и уровнем жизни. Так, ежегодная заболеваемость БК максимальна в Северной Америке (20,2 случая на 100 000 человек в год). Что касается НЯК, наиболее подвержены данной патологии жители Западной Европы (24,3 случая на 100 000 человек в год) [1, 2]. Повышение уровня жизни, активная индустриализация и вестернизация привели к увеличению количества пациентов с впервые диагностированными хроническими воспалительными заболеваниями кишечника в Китае, Индии, Южной Корее, и других странах [2].

Известно, что БК и НЯК являются полиэтиологическими заболеваниями и множество факторов, включая генетическую предрасположенность, особенности микробиоценоза

кишечника, инфекционные патогены, употребление препаратов различных фармакологических групп, курение, особенности питания, социально-экономические факторы, рассматриваются в качестве возможных триггеров развития и прогрессирования хронических воспалительных заболеваний кишечника [2]. В последние годы накопились достоверные данные о вовлеченности пищевых добавок в развитие БК и НЯК [3]. В частности, гетерополисахарид каррагинан, или пищевая добавка E407, который выделяется из Ирландского мха и используется в пищевой промышленности благодаря хорошо выраженным гелеобразующим свойствам, может рассматриваться в качестве одного из агентов, запускающих развитие БК и НЯК. Данное утверждение обосновано хорошо известной способностью E407 индуцировать интестинальное воспаление в эксперименте [4 – 6]. Изучение тонких особенностей хронического каррагинан-индуцированного воспаления желудочно-кишечного тракта может позволить оценить возможную роль пищевой добавки E407 в этиологии БК и НЯК.

Целью исследования: было изучение уровня провоспалительного цитокина ФНО- α и матричной металлопротеиназы-9 (ММР-9), а также анализ возможной взаимосвязи данных показателей, при длительном пероральном употреблении гелеобразователя и загустителя Е407.

Материалы и методы

Для проведения эксперимента тридцать половозрелых крыс-самок линии Вистар, содержащихся в стандартных условиях вивария Харьковского национального медицинского университета, были поделены на три равные группы ($n = 10$): I – интактные животные, которые использовались в качестве контроля; II – лабораторные животные, которые употребляли 1% раствор пищевой добавки Е407 в питьевой воде ежедневно в течение двух недель; III – животные, которые употребляли 1% раствор Е407 в питьевой воде на протяжении 28 дней. Ранее проведенные нами морфологические исследования показали, что воздействие каррагинана на слизистую оболочку при пероральном введении приводит к развитию выраженного воспалительного процесса на протяжении всего желудочно-кишечного тракта (гастроэнтероколит) [4]. Все манипуляции с лабораторными животными выполняли в соответствии с Европейской конвенцией «О защите позвоночных животных, которые используются для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986) и VIII Директивы 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского Союза от 22.09.2010 г. по охране животных, используемых в научных целях. Животных выводили из эксперимента путем декапитации под тиопенталовым наркозом. Кровь центрифугировалась и сыворотка использовалась для исследования. Содержание ФНО- α и ММР-9 определяли иммуноферментным методом в соответствии с инструкциями, которые были приложены к наборам фирм «Вектор БЕСТ» (Новосибирск, Российская Федерация) и «eBioScience» (Вена, Австрия).

Статистическую обработку всех результатов проводили с помощью программы Graph Pad Prism 5.0 с использованием критерия Стьюдента для оценки достоверности полученных результатов. Корреляционную зависимость определяли путем подсчитывания непараметрического коэффициент корреляции Спирмена.

Результаты исследований и их обсуждение

Установлено, что у животных второй и третьей групп достоверно повышен уровень ФНО- α (табл.) в сыворотке крови (соответственно пяти- и семикратное повышение по сравнению с аналогичным показателем контрольной группы). Принимая во внимание провоспалительную роль

ФНО- α , повышение концентрации данного цитокина указывает на развитие выраженного воспалительного процесса. Известно, что ФНО- α является одним из «дирижеров» иммунного ответа и вовлечен в регуляцию многочисленных компонентов иммунного ответа, в том числе ремоделирование внеклеточного матрикса [7]. В ряде работ показано, что влияние ФНО- α на состояние внеклеточного матрикса опосредовано регулированием активности матриксных металлопротеиназ, в частности ММР-9 [7, 8]. Нами установлено, что пероральное употребление каррагинана приводит к достоверному повышению уровня, а следовательно и активности, ММР-9 (табл. 1): у животных группы № 2 уровень ММР-9 повышен в 1,7 раз по сравнению с контролем, а у животных группы № 3 – в 3,6 раза. Подобные изменения экспрессии ММР-9 указывают на активацию ремоделирования соединительной ткани, характерного для хронических воспалительных процессов.

Прогрессирование воспалительного процесса сопровождается однонаправленными динамическими изменениями исследуемых параметров, что позволило предположить наличие стимулирующего влияния ФНО- α на экспрессию ММР-9. Для оценки степени влияния ФНО- α на активность ММР-9 при употреблении каррагинана определяли коэффициент Спирмена. Обнаружено наличие средней положительной корреляционной связи между уровнями провоспалительного цитокина и содержанием протеолитического фермента у животных как второй ($r=+0,58$), так и третьей группы ($r=+0,66$). Подобные изменения коэффициента корреляции указывают на вовлеченность ФНО- α в регуляцию экспрессии ММР-9 на различных стадиях каррагинан-индуцированного интестинального воспаления. Можно предположить, что не только ФНО- α , но и другие факторы также могут влиять на ММР-9-зависимое ремоделирование внеклеточного матрикса при данной патологии. Анализ данного вопроса – перспектива наших дальнейших исследований.

Известно, что стимулирующее действие ФНО- α на ММР-9 может быть опосредовано активацией внеклеточной сигнал-регулирующей киназы (ERK1/2), p38 MAP киназы и JNK киназы (c-Jun N-terminal kinase) [8]. Мы предполагаем, что основной механизм влияния ФНО- α на активность ММР-9 при каррагинан-индуцированном воспалении заключается в активации JNK киназы. Основой для данного предположения является то, что протеинкиназа-1, регулирующая апоптотический сигнал (ASK-1), стимулирует синтез JNK киназы [9]. В наших предыдущих работах показано, что активность ASK-1 при каррагинан-индуцированном гастроэнтероколите увеличивается [10]. Помимо этого, JNK киназа вовлечена в регуляцию апоптоза, пролифе-

Таблиця 1

Содержание матричной металлопротеиназы-9 и ФНО- α в сыворотке крови животных (M \pm m)

Показатель	Контрольная группа	Двухнедельное пероральное употребление добавки E407	Четырехнедельное пероральное употребление добавки E407
	n=10	n=10	n=10
Матричная металлопротеиназа-9 (ММР-9), нг/мл	2,22 \pm 0,12	3,95 \pm 0,09 p<0,0001	8,01 \pm 0,15 p<0,0001
ФНО- α (пг/мл)	4,14 \pm 0,70	23,55 \pm 3,66 p=0,0004	29,47 \pm 5,24 p=0,0007

рации клеток и неоангиогенеза. Нами продемонстрировано, что развитие каррагинанового гастроэнтероколита сопровождается активацией апоптоза энтероцитов кишечника [6], пролиферации энтероцитов [6] и неоангиогенеза [11], что косвенно позволяет предположить повышение экспрессии JNK киназы при хроническом каррагинининдуцированном гастроэнтероколите.

Выводы

1. Длительный пероральный прием добавки E407 приводит к повышению концентраций ФНО- α и ММР-9, что указывает на активацию воспаления и процессов ремоделирования внеклеточного матрикса кишечника.

2. Наличие положительной корреляционной связи между уровнями ФНО- α и ММР-9 позволяет судить о стимулирующем влиянии ФНО- α на экс-прессию ММР-9 и роли ММР-9 в ФНО- α -зависимом ремоделировании соединительной ткани.

3. Косвенные данные указывают на вовлеченность JNK-опосредованного механизма ФНО- α -зависимой активации ММР-9.

Перспективы дальнейших исследований.

Полученные данные обосновывают перспективу дальнейших исследований, направленных на изучение особенностей патогенеза каррагинининдуцированного воспаления, в частности, определения активности JNK киназы.

Список літератури

- Molodecky N. A. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review / N. A. Molodecky, I. S. Soon, D. M. Rabi [et al.] // *Gastroenterology* – 2012. – Vol. 142. – P. 46-52.
- Ponder A. A clinical review of recent findings in the epidemiology of inflammatory bowel disease / A. Ponder, M. Long // *Clin. Epidemiol.* – 2013. – Vol. 5. – P. 237-247.
- Qin X. Food additives: possible cause for recent remarkable increase of inflammatory bowel disease in children / X. Qin // *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* – 2012. – Vol. 44, (4). – P. 564.
- Пат. 97322 Україна, МПК G09B 23/28. Спосіб моделювання хронічного гастроентероколіту / Іваненко Т. О., Коробчанський В. О., Губіна-Вакулик Г. І., Горбач Т. В., Колоусова Н. Г.; Заявник Харківський національний медичний університет. – № заяв. а201014510 від 06.12.2010; опубл. 25.01.2012, Бюл. № 2.
- Губина-Вакулик Г. А., Морфологическое состояние тонкого кишечника при длительном употреблении пищевой добавки каррагинан / Г. А. Губина-Вакулик, А. С. Ткаченко, М. А. Орлова // *Вісник проблем біології і медицини.* – 2014. – Т. 3 (109), Вип. 2. – С. 252–256.
- Gubina-Vakyulyk G. I. Damage and regeneration of small intestinal enterocytes under the influence of carrageenan induces chronic enteritis / G. I. Gubina-Vakyulyk, T. V. Gorbach, A. S. Tkachenko [et al.] // *Comparative Clinical Pathology* – 2015. – Vol. 24, (6). – p. 1473–1477.
- Yabluchanskiy A. Matrix metalloproteinase-9: many shades of function in cardiovascular disease / A. Yabluchanskiy, Y. Ma, R. Iyer [et al.] // *Physiology (Bethesda)* – 2013. – Vol. 28, (6). – P. 391–403.
- Lee S. Activation of matrix metalloproteinase-9 by TNF- α in human urinary bladder cancer HT1376 cells: the role of MAP kinase signaling pathways / S. Lee, S. Park, Y. Cho [et al.] // *Oncol. Rep.* – 2008. – vol. 19, (4). – P. 1007–13.
- Liu Y. Laminar flow inhibits TNF-induced ASK1 activation by preventing dissociation of ASK1 from its inhibitor 14-3-3/Y. Liu, G. Yin, J. Surapitsitchat J [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 2001. – vol. 107. – P. 917–23.
- Жуков В. И. Система перекисного окисления липидов и активность апоптоза при экспериментальном хроническом гастроэнтероколите / В. И. Жуков, А. С. Ткаченко // *Научные ведомости Белгородского университета. Медицина. Фармация (Российская Федерация).* – 2013. – №18 (161), Вып. 23. – С. 138–141.
- Ткаченко А. С. Уровень VEGF и ФНО- α при хроническом каррагинан-индуцированном гастроэнтероколите / А. С. Ткаченко // *Вісник проблем біології і медицини.* – 2013. – Т. 2 (103), Вип. 3. – С. 231–234.

Стаття надійшла до редакції 9.03.2017

А. С. Ткаченко, В. І. Жуков, Т. В. Горбач, І. М. Васильєва, М. О. Ткаченко
Харківський національний медичний університет

ВМІСТ МАТРИКСНОЇ МЕТАЛЛОПРОТЕІНАЗИ-9 ТА ФНП- α У СИРОВАТЦІ КРОВІ ПРИ ВЖИВАННІ ХАРЧОВОЇ ДОБАВКИ E407

У даний час відзначається тенденція зростання поширеності хронічних запальних захворювань кишечника – хвороби Крона і неспецифічного виразкового коліту. Однією з можливих причин може бути споживання різних харчових добавок, а саме загущувача E407 (карагенан), який здатний викликати запалення кишечника в експерименті при тривалому вживанні.

Метою дослідження було вивчення рівня прозапального цитокіну ФНП- α і матриксної металопротеїнази-9 (ММР-9), а також аналіз їх можливого взаємозв'язку, при E407-індукованому гастроентероколіті.

Лабораторні тварини були розділені на три групи: контрольна група ($n = 10$), двотижневе вживання E407 ($n = 10$), чотиритижневе вживання E407 ($n = 10$). Пероральний прийом E407 призводив до розвитку гастроентероколіту. Рівень ФНП- і ММР-9 визначали імуноферментним методом у сироватці крові.

Встановлено виражене достовірне підвищення як ФНП- α , так і ММР-9 при прийомі карагенану. Виявлено наявність середнього кореляційного зв'язку між вивченими показниками при прийомі E407.

Таким чином, позитивна кореляція між ФНП- α і ММР-9 дозволяє припустити наявність стимулюючого впливу ФНП- α на експресію ММР-9 і потенційну роль ММР-9 в ФНП- α -залежному ремоделюванні сполучної тканини. Ми припускаємо, що JNK кіназа залучена в ФНП- α -залежну активацію ММР-9.

Ключові слова: гастроентероколіт, карагенан, хронічне запалення, ФНП- α , матриксна металопротеїназа-9.

A. S. Tkachenko, V. I. Zhukov, T. V. Gorbach, I. M. Vasilieva, M. O. Tkachenko
Kharkiv National Medical University

INTAKE OF FOOD ADDITIVE E407 INCREASES MATRIX METALLOPROTEINASE-9 AND TNF-ALPHA SERUM LEVELS

Currently, there is a trend that demonstrates the high incidence rate of chronic inflammatory bowel disease – Crohn's disease and ulcerative colitis. The consumption of various food additives, including E407 (carrageenan), which is confirmed to cause intestinal inflammation in the experiment, seems to be one of the possible reasons.

The aim of the research was to study the pro-inflammatory cytokine TNF-alpha level and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) concentration, as well as to make analysis of their possible relationship, in E407-induced gastroenterocolitis.

Laboratory animals were divided into three groups: control group ($n = 10$); two weeks of E407 intake ($n = 10$); four weeks of E407 intake ($n = 10$). Oral E407 consumption leads to the development of gastroenterocolitis. TNF- and MMP-9 serum levels were determined by ELISA.

A significant increase in TNF- α and MMP-9 expression was found. The positive correlation between the studied parameters was detected.

Thus, the positive correlation between TNF- α and MMP-9 allows us to presume that there is a stimulatory effect of TNF- α on the MMP-9 expression. In addition, MMP-9 may take part in TNF- α -dependent extracellular matrix remodeling in carrageenan-induced gastroenterocolitis. We hypothesized that c-Jun N-terminal kinase was involved in TNF-alpha-dependent MMP-9 activation.

Keywords: gastroenterocolitis, carrageenan, chronic inflammation, TNF-alpha, matrix metalloproteinase-9.