

УДК 616.33:616.348]-002.-018.74-092.9

© А.С. Ткаченко, 2014.

ПОКАЗАТЕЛИ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ЭНДОТЕЛИЯ СОСУДОВ ТОНКОГО КИШЕЧНИКА ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ГАСТРОЭНТЕРОКОЛИТЕ

А.С. Ткаченко*Харьковский национальный медицинский университет, г. Харьков.*

THE FUNCTIONAL STATE OF THE VASCULAR ENDOTHELIUM OF THE SMALL INTESTINE IN EXPERIMENTAL CHRONIC GASTROENTEROCOLITIS

A.S. Tkachenko

SUMMARY

In recent years, there has been a tendency of an increase in inflammatory bowel disease morbidity, including Crohn's disease and ulcerative colitis. It has been established that features of the modern diet may be considered as a possible source of the development of these diseases. The aim of the investigation was to study the levels of endothelin-1 and S-nitrosothiols in the homogenate of the small intestine of rats with chronic carrageenan-induced gastroenterocolitis. The data obtained suggest the presence of endothelial dysfunction in carrageenan-induced inflammation of the intestine, and it plays an important role in the pathogenesis of the disease.

ПОКАЗНИКИ ФУНКЦІОНАЛЬНОГО СТАНУ ЕНДОТЕЛІЮ СУДИН ТОНКОГО КИШЕЧНИКУ ПРИ ХРОНІЧНОМУ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ ГАСТРОЕНТЕРОКОЛІТІ

А.С. Ткаченко

РЕЗЮМЕ

В експерименті вивчено вміст ендотеліну-1 і S-нітрозотіолів в гомогенаті тонкого кишечника щурів з хронічним карагенан-індукованим гастроентероколітом. Встановлено, що дане захворювання супроводжується підвищенням рівня ендотеліну-1 у гомогенаті тонкого кишечника, більш вираженому при прогресуванні хронічного запалення. При хронічному карагенан-індукованому гастроентероколіті спостерігається незначне підвищення вмісту S-нітрозотіолів у гомогенаті тонкого кишечника з подальшим його зниженням при прогресуванні захворювання. Подібні зміни дозволяють зробити висновок про наявність ендотеліальної дисфункції при карагенановому запаленні кишечника та її важливої ролі в патогенезі досліджуваного захворювання.

Ключевые слова: гастроэнтероколит, каррагинан, крысы, эндотелин-1, S-нитрозотиолы.

В последние годы намечается тенденция к увеличению заболеваемости хроническими воспалительными заболеваниями кишечника [3, 6], к которым относят болезнь Крона и язвенный колит. Установлено, что особенности современного питания могут рассматриваться в качестве возможного источника развития данных заболеваний [10]. В частности, пищевая добавка каррагинан (E407), которая используется в пищевой промышленности в качестве загустителя и гелеобразователя, может являться потенциальным этиологическим фактором хронических воспалительных заболеваний кишечника. Косвенное доказательство связи между употреблением каррагинана и распространенностью язвенного колита состоит в схожем географическом распределении между высоким уровнем потребления каррагинана в питании и высокой распространенностью хронических воспалительных заболеваний кишечника. Язвенный колит широко распространен в Северной Америке, Соединенном Королевстве, стра-

нах Скандинавии, и реже встречается в Центральной и Южной Европе, странах Азии и Африки [8]. Прослеживается четкая тенденция взаимосвязи между пораженностью населения язвенным колитом и высоким уровнем потребления каррагинана, что обеспечивает доказательную базу потенциальной этиологической роли каррагинана в патологии пищеварительной системы человека [7]. Несмотря на разработанную модель хронического каррагинан-индуцированного гастроэнтероколита средней степени тяжести, без язвенно-некротического процесса, путем использования низких доз каррагинана [4] и изучение некоторых особенностей каррагинанового воспаления в кишечнике [2, 5], механизмы развития данного заболевания и особенности повреждения тонкого кишечника остаются невыясненными. В частности, не изучено состояние эндотелия сосудов тонкого кишечника при каррагинан-индуцированном интестинальном воспалении.

Целью работы было изучение уровней эндоте-

лина-1 и S-нитрозотиолов в гомогенате тонкого кишечника крыс при развитии хронического каррагинан-индуцированного гастроэнтероколита.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперимент проводили на половозрелых крысах-самках линии Вистар, которые содержались в стандартных условиях вивария. Животные были разделены на 3 группы. Первая группа состояла из животных, которые принимали пищевую добавку каррагинан в течение 2 недель, а животные второй группы - в течение 4 недель, что приводило к развитию хронического гастроэнтероколита, наличие которого было подтверждено биохимическими и морфологическими методами [4]. Контрольная группа состояла из интактных животных. Моделирование заболевания осуществлялось путем свободного доступа экспериментальных животных к 1% раствору каррагинана в питьевой воде [4]. Содержание животных и манипуляции над ними проводили в соответствии с положениями Европейской конвенции «О защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986). Лабораторных животных выводили из эксперимента путем декапитации под тиопенталовым наркозом. Немедленно после декапитации кишечник извлекали на холоде и перфузировали охлажденным физиологическим раствором. Ткань замораживали, измельчали до порошкообразного состояния. Готовили гомогенат в 0,25 М трис HCl, содержащий 0,32 М сахарозы (в соотношении 1:9). Гомогенат центрифугировали 15 минут при 3000 об./мин. (1200 g), супернатант использовали для исследования. Уровень эндотелина-1 в гомогенате кишечника определяли иммуноферментным методом с помощью набора реактивов фирмы Amersham (Великобритания). Для оценки содержания S-нитрозотиолов в гомогенате тонкого кишечника использовали спектрофлуориметрический метод [9]. Статистическую обработку данных про-

водили 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 $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Определение уровня эндотелина-1 в гомогенате тонкого кишечника экспериментальных животных через две недели после начала приема каррагинана продемонстрировало достоверное повышение его уровня в 1,8 раза, а через четыре недели - в 2,9 раз, по сравнению с животными контрольной группы (табл.). Поскольку эндотелин-1 является одним из важнейших регуляторов функционального состояния эндотелия, оказывающим вазоконстрикторное действие, изменения его уровня в крови и тканях могут служить критерием оценки функции эндотелия [1]. Известно, что эндотелин-1 снижает продукцию и биодоступность оксида азота, а также экспрессию NO-синтазы в эндотелиальных клетках [11], снижение активности которой наблюдается при хроническом каррагинан-индуцированном воспалении желудочно-кишечного тракта [2]. Другой механизм, связывающий эндотелин-1 и NO, обусловлен образованием активных форм кислорода, что приводит к снижению биодоступности оксида азота через генерацию пероксинитрита. Кроме прямого вазомоторного эффекта, эндотелин-1 вовлечен в развитие воспалительного процесса. Показано активирующее влияние эндотелина-1 на макрофаги, приводящее к генерации ими провоспалительных медиаторов, включая ФНО-б, ИЛ-1, ИЛ-6 и ИЛ-8 [11]. Развитие каррагинан-индуцированного гастроэнтероколита сопровождается повышением уровня ФНО-б в сыворотке крови [5], повышенная продукция которого может быть обусловлена в том числе и стимулирующим эффектом эндотелина-1.

Таблица 1
Содержание эндотелина-1 и S-нитрозотиолов в гомогенате тонкого кишечника экспериментальных животных ($M \pm m$)

Показатели	Животные контрольной группы	Животные, употреблявшие каррагинан 2 недели	Животные, употреблявшие каррагинан 4 недели
	n=10	n=10	n=10
Эндотелин-1, пкг/ г. белка	2,340±0,27	4,17±0,31 $p < 0,001$	6,72±0,07 $p < 0,001$
S – нитрозотиолы, мкмоль/л	0,48±0,02	0,57±0,03 $p < 0,001$	0,28±0,02 $p < 0,001$

В ходе проведенного исследования выявлено незначительное статистически достоверное повышение уровня S-нитрозотиолов (на 19%) при упот-

реблении каррагинана в течение 2 недель, при сравнении с крысами контрольной группы (табл.). При дальнейшем употреблении каррагинана уровень S-

нитрозотиолов снижается - у крыс второй группы наблюдается снижение на 42% по сравнению с контрольной группой (табл.). Прежде всего, циркулирующий пул NO образует S-нитрозотиолы, которые рассматривают как буферную систему, играющую важную роль в хранении и транспортировке оксида азота. Особенно важно то, что S-нитрозотиолы способны выделять оксид азота в местах его физиологической необходимости, поэтому S-нитрозотиолы рассматриваются как основное депо NO в организме. Повышение концентраций S-нитрозотиолов в гомогенате тонкого кишечника свидетельствует о наличии метаболитов NO, имеющих потенциальную биологическую активность и, таким образом, позволяет предположить отсутствие количественного дефицита NO у лабораторных животных первой группы. Снижение концентрации S-нитрозотиолов в гомогенате кишечника животных второй группы может отражать уменьшение продукции оксида азота NO-синтазами. Такие изменения уровня S-нитрозотиолов свидетельствуют о дефиците оксида азота при 4-недельном употреблении каррагинана.

ВЫВОДЫ

1. Хронический каррагинан-индуцированный гастроэнтероколит сопровождается повышением уровня эндотелина-1 в гомогенате тонкого кишечника, более выраженном при 4-недельном употреблении каррагинана по сравнению с 2-недельным.
2. Пониженное содержание S-нитрозотиолов в гомогенате тонкого кишечника при более поздних стадиях хронического каррагинан-индуцированного гастроэнтероколита в сочетании с отсутствием количественного дефицита NO при 2-недельном употреблении каррагинана указывает на потенциальную роль недостаточности NO в прогрессировании интестинального воспаления.
3. Обнаруженный дисбаланс между вазоконстрикторами и вазодилататорами при хроническом каррагинан-индуцированном гастроэнтероколите указывает на наличие нарушений микроциркуляции в тонком кишечнике и развитие эндотелиальной дисфункции, более выраженной при длительном употреблении пищевой добавки каррагинан.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ватутин, Н.Т. Эндотелины и сердечно-сосудистая патология / Н.Т. Ватутин, Н.В. Калинкина, А.Л. Демидова // Укр. кардіол. журн. — 2006. — № 1. — С. 101-106.
2. Жуков, В.И. Система перекисного окисления липидов и активность апоптоза при экспериментальном хроническом гастроэнтероколите / В.И. Жуков, А.С. Ткаченко // Науч. Вед. Бел. ун. Медицина. Фармация. - № 18 (161), Вып. 23. — С. 138-141.
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 винахід № 97322 от 25.01.12 «Спосіб моделювання хронічного гастроентероколіту».
5. Ткаченко, А.С. Уровень VEGF и ФНО-б при хроническом каррагинан-индуцированном гастроэнтероколите / А.С. Ткаченко // Вісн. проб. біол. і мед. — Том 2 (103), Вип. 3. — 2013. — С. 231-234.
6. Ekblom A. The epidemiology of IBD / A. Ekblom // In?amm. Bowel. Dis. — 2004. — Vol. 10 (Suppl. 1). - P. 32-43.
7. Ferlay J. Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide. / J. Ferlay, F. Bray, P. Pisani [et al.] // Globocan 2000, Version 1.0., IARC CancerBase No 5 Lyon, IARCPress — 2001.
8. Irvine E.J. A critical review of epidemiological studies in inflammatory bowel disease. / E.J. Irvine, F. Farrokhvar, E.T. Swarbrick // Scand. J. Gastroenterol. — 2001. — Vol. 36 (1). - P. 2-15.
9. Marzining M. Improved methods end products of nitric oxide in biological fluids: nitrites, nitrates and S-nitrosothiols / M. Marzining, A.K. Nussler, J. Stadler // Nitric oxide. — 1997. - Vol.1. — P. 177-189.
10. Ries L.A.G. SEER Cancer Statistics Review 1973-1996. Bethesda / L.A.G. Ries, C.L. Kosary, B.F. Hankey // National Cancer Institute. - 1999. — 60 p.
11. Ruetten H. Endothelin-1 stimulates the biosynthesis of tumour necrosis factor in macrophages: ET-receptors, signal transduction and inhibition by dexamethasone. / H. Ruetten, C. Thiernemann // J. Physiol. Pharmacol. — 1997. — №. 48. - P. 675-688.