DOI DOI 10.31718/2077–1096.25.1.102
УДК 616.348-002.2-092.9:612.015.11

Бабенко О.В., Наконечна О.А.

СТАН ОКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ В ОРГАНІЗМІ ЩУРІВ З ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИМ КОЛІТОМ

Харківський національний медичний університет, Харків, Україна

Актуальність. На теперішній час запальні захворювання органів шлунково-кишкового тракту: ентероколіти, гострі та хронічні коліти є одними з найбільш актуальних проблем сучасної гастроентерології. Найбільш актуальним захворюванням, поширеність якого зростає у всьому світі, є гострий або хронічний коліт, при якому відбувається запалення слизової оболонки товстої кишки. Метою дослідження було визначення стану оксидантної системи за вмістом в крові 8-ізопростану та стан ензиматичної ланки антиоксидантної системи за активністю супероксиддисмутази та каталази в крові інтактних тварин та щурів з експериментальним колітом. Матеріали та методи. У дослідженні було використано 18 дорослих щурів обох статей популяції WAG віком 4-5 місяців, вагою 225-240 гр. Експериментальні дослідження проводили з дотриманням етичних норм (Directive 86/609/EEC) положень Європейської конвенції про захист безхребетних тварин, які використовуються для експериментів та наукових цілей (2005) та «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах» (2013). Вміст 8-ізопростану та активність ензимів визначали імуноферментним методом. Результати. На теперішній час найбільш актуальним в гастроентерології та медичній біохімії є питання щодо визначення основних ланок патогенезу хронічного коліту. В етіопатогенезі хронічного коліту значну роль відіграє надмірне утворення активних форм кисню, розвиток оксидативного стресу, що сприяє дизрегуляції передачі різних сигналів, синтезу прозапальних молекул. Одним з основних біохімічних маркерів ліпідної пероксидації та раннього стресу є 8-ізопростан. У відповідь на підвищення метаболітів перекисного окиснення ліпідів в організмі спрацьовує антиоксидантна система. Ця система контролює ефекти вільних радикалів та підтримує окислювально-відновний баланс в організмі. Нами було досліджено активність ензимів - антиоксидантів, до яких відносять супероксиддисмутазу, каталазу. У щурів з хронічним колітом на 68,6 % підвищувався вміст 8-ізопростану та активність супероксиддисмутази на 46,47 %, а каталази – на 95,1%, у порівнянні з визначеними показниками у інтактної групи. Це свідчить про активацію ензиматичної ланки антиоксидантного захисту в крові у порівнянні з показником у інтактних тварин на відповідь підвищення ліпідної пероксидації. Висновки. Після проведеної терапії наночастинками діоксиду церію спостерігалося зниження в крові вмісту 8-ізопростану на 24,7% у порівнянні з цим показником до проведення корекції, однак цей показник не повертався до значень у контрольній групі. Також визначалося зниження як активності супероксиддисмутази, так й каталази, приблизно на 22,0% .

Ключові слова: хронічний коліт, 8-ізопростан, супероксиддисмутаза, каталаза.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Роботу виконано в рамках науково-дослідної теми кафедри біологічної хімії ХНМУ «Біохімічні механізми індукції запалення кишківника та засоби його корекції», № державної реєстрації 0120U102645.

Вступ

На теперішній час запальні захворювання органів шлунково-кишкового тракту: ентероколіти, гострі та хронічні коліти є одними з найбільш актуальних проблем сучасної гастроентерології [1]. Найбільш актуальним захворюванням, поширеність якого зростає у всьому світі, є гострий або хронічний коліт, при якому відбувається запалення слизової оболонки товстої кишки. Основними клінічними симптомами є біль в животі, тенезми, діарея, нудота, лихоманка, втома, поява домішок крові у калі. За сучасною класифікацією коліт буває різних типів, існують різні патофізіологічні механізми розвитку цього патологічного стану, зокрема порушення якісного та кількісного складу мікробіоти, що призводить до порушень синтезу біологічно активних сполук, зокрема, вітамінів групи В, наслідком чого є зміни метаболізму. Наразі хронічний коліт розглядається як аутоімунне захворювання [2]. Слід також зазначити, що за хронічних ентероколітів практично завжди мають місце порушення травлення та абсорбції поживних речовин, активація процесів гниття, що також чинить негативний вплив на загальний стан організму. Таким чином, актуальність наукових досліджень, присвячених вивченню біохімічних механізмів розвитку хронічного коліту, обумовлено високою медико-соціальною значущістю, постійним зростанням захворюваності у світі, втратою працездатності та інвалідизацією пацієнтів.

Мета дослідження

визначити стан оксидантної системи за вмістом в крові основного біохімічного маркеру – 8-ізопростану та стан ензиматичної ланки антиоксидантної системи за активністю супероксиддисмутази та каталази в крові інтактних тварин та щурів з експериментальним хронічним колітом.

Матеріали та методи дослідження

У дослідженні було використано 18 дорослих щурів обох статей популяції WAG віком 4-5 місяців, вагою 225-240 гр., які було поділено на три групи, по шість тварин у кожній (n=6). Тварини були отримані з Експериментальної біологічної клініки ХНМУ. Контрольна група (n=6) скла-

далася з інтактних тварин, що вживали питну воду. Експериментальна група №1 (n=6) включала щурів з експериментальним хронічним колітом, викликаним пероральним введенням 2,5% розчину декстрансульфату натрію (DSS) (молекулярна маса: 40кДа; PanReac AppliChem, Німеччина) у питній воді за схемою: з 1-ї по 5-ту добу, з 13-ї по 17-ту добу, з 25-ї по 29-ту добу тваринам дослідної групи перорально вводили розчин DSS у питній воді; з 6-ї по 12-ту добу, з 18-ї по 24-ту, з 30-ї по 38-му добу щури отримували питну воду [3, 4]. На 39-й день тварин виводили з експерименту за допомогою гільйотинного ножа. До експериментальної групи №2 (n=6) увійшли щури, яким після експериментального моделювання хронічного коліту корелювали патологічний стан пероральним введенням 0,5 мл 1% розчину діоксиду церію (CeO_2), починаючи з 39 – ої доби експерименту протягом 14 діб. Щурів даної групи виводили з експерименту шляхом цервікальної дислокації на 54-ту добу.

Експериментальні дослідження проводили з дотриманням етичних норм (Directive 86/609/EEC) положень Європейської конвенції про захист безхребетних тварин, які використовуються для експериментів та наукових цілей (2005) та «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах» (2013). Проведені експериментальні дослідження ухвалено Комітетом з біоетики ХНМУ згідно Закону України №3447-IV ст.26 ЗУ «Про захист тварин від жорстокого поводження» (протокол № 6 від 2 жовтня 2019 року).

Вміст 8-ізопростану у сироватці крові щурів у пг/мл визначали імуноферментним методом за допомогою наборів реактивів «8-isoprostane EIA KIT" (Cayman Chemical, USA) з використанням спектрофотометру «Solar» PV-1251 C при довжині хвилі 412 нм. Активність супероксиддисмутази (СОД) визначали імуноферментним методом за допомогою набору реактивів «SOD ELISA Kit» (Fine Test, USA) з використанням спектрофотометру «Solar» PV-1251 C при довжині хвилі 450 нм. Активність каталази (КТ) визначали імуноферментним методом за допомогою набору реактивів «Catalase ELISA Kit» (Elabscience, USA) на імуноферментному аналізаторі «Stat Fax 1904».

Статистичну обробку отриманих даних проводили за допомогою «GraphPad Prism 5». Для порівняння показників двох незалежних груп використовували непараметричний критерій Mann-Whitney. За умов непараметричного U критерію отримані цифрові результати представляли у вигляді медіани (Me) та інтерквартильного розмаху (25%;75%). Різниця між групами вважалася статистично значущою при $p<0,05$.

Результати дослідження

На теперішній час ключовим маркером розвитку раннього оксидативного стресу є 8-ізопростан, простагландиноподібна речовина класу ізопростанів F2. Відомо, що цей маркер ліпідної пероксидації та раннього оксидативного стресу в організмі утворюється внаслідок не ензиматичного вільнорадикального процесу (ВРП) окиснення арахідонової кислоти.

Нами було визначено вміст 8-ізопростану в крові щурів як основного біохімічного маркеру ліпідної пероксидації, що знайшло відображення в рисунку 1. У щурів з хронічним колітом на 68,6 % підвищувався вміст 8-ізопростану в крові у порівнянні з показником у інтактних тварин. У щурів з експериментальним колітом спостерігається більш виразна активація ВРП та ліпідної пероксидації.

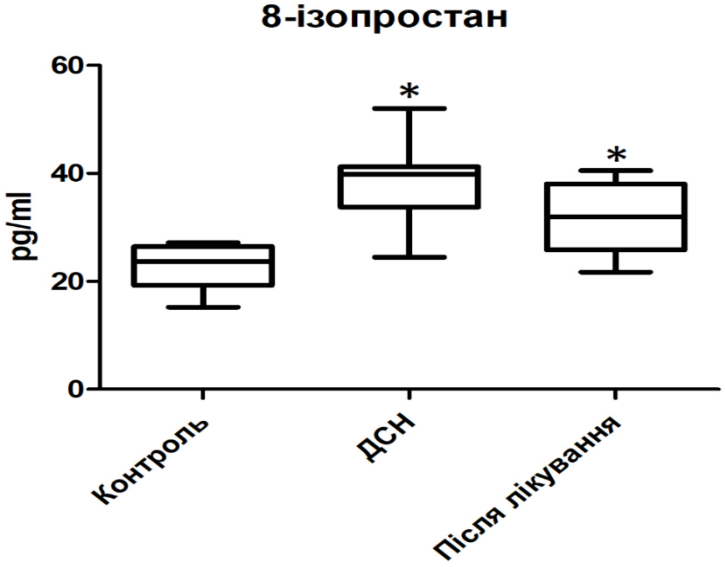

Рисунок 1. Вміст 8-ізопростану (пг/мл) в крові щурів групи контролю та щурів з хронічним колітом до та після корекції діоксидом церію

Примітка: - достовірність відмінностей у порівнянні з показником у інтактних щурів*

Після проведеної корекції наночастинками діоксиду церію вміст 8-ізопростану в крові знижувався на 24,7% у порівнянні з цим показником до проведення корекції, однак ще не повертався до показників у щурів контрольної групи.

Відомо, що на протидію підвищення метаболітів оксидантної системи в організмі починає працювати антиоксидантна система (АОС), що контролює біохімічні ефекти вільних радикалів та підтримує окислювально-відновний баланс в організмі. У крові щурів з експериментальним колітом визначається значне підвищення активності антиоксидантних ферментів: СОД підвищується на 46,47 %, а КТ – на 95,1 %, що свідчить про активацію ензиматичної ланки антиоксидантного захисту у відповідь на підвищення вмісту 8-ізопростану в крові (рис. 2 та рис. 3).

Після проведеної корекції наночастинками діоксиду церію визначалося зниження як активності СОД, так й каталази, приблизно на 22,0% .

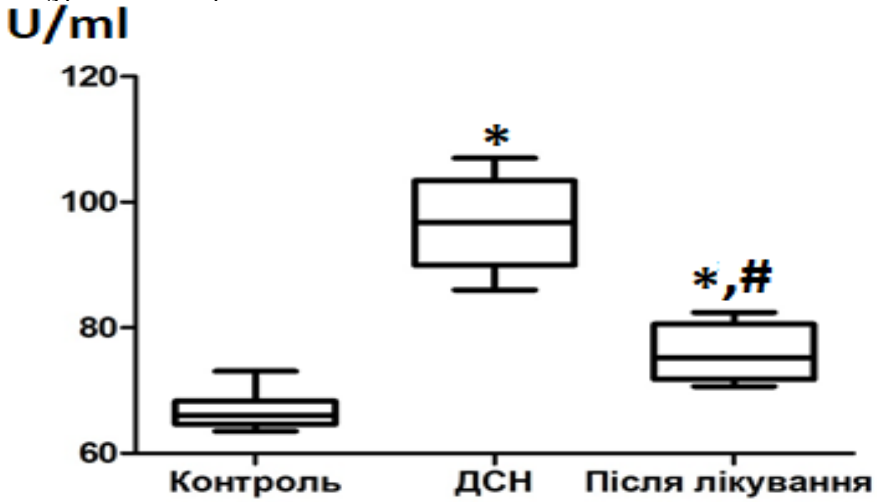

Рисунок 2. Активність супероксиддисмутази в крові щурів контрольної групи та тварин з хронічним колітом до та після корекції діоксидом церію

*Примітки: * - достовірність відмінностей у порівнянні з показником у інтактних щурів;*
 # - достовірність у порівнянні з показником до корекції

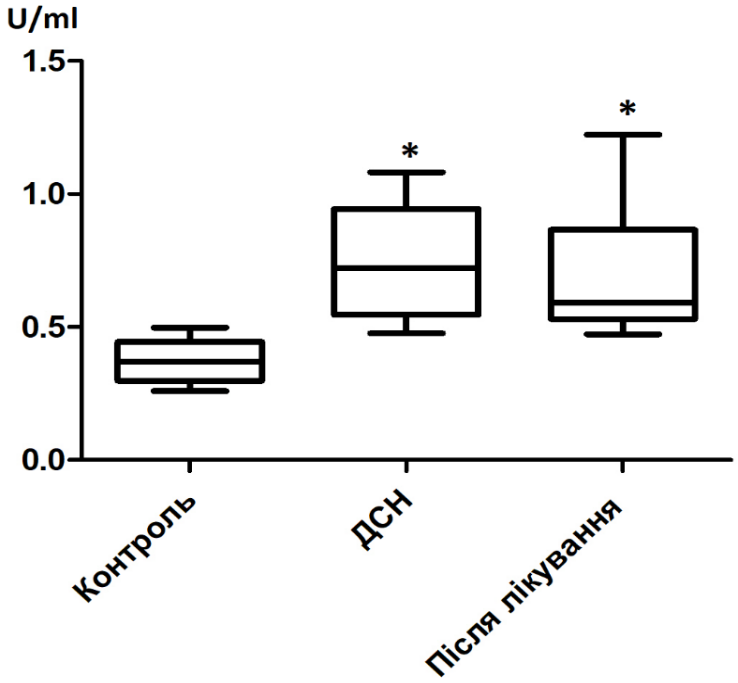

Рисунок 3. Активність каталази в крові щурів контрольної групи та тварин з хронічним колітом до та після корекції діоксидом церію

*Примітка: * - достовірність відмінностей у порівнянні з показником у інтактних щурів*

Обговорення

При аналізі отриманих даних в роботі визначалося, що у щурів з експериментальним колітом на 30-ту добу дослідження спостерігається більш виразна активація ВРП та перекисного окиснення ліпідів в організмі. Наразі існують декілька наукових робіт, де визначалися такі маркери оксидативного стресу, як малоновий діальдегід, 8-гідрокси-2'-дезоксигуанозин, вільні тіоли в біоматеріалі, зокрема калі та крові хворих на запальні захворювання кишківника. За даними авторів, визначається підвищення маркерів оскидативного стресу в крові й калі хворих та їх вміст корелює з тяжкістю захворювання [5, 6], що співпадає з результатами нашого дослідження щодо ролі оксидативного стресу в патогенезі хронічного коліту. Однак, в існуючій науковій літературі ми не знайшли наукових робіт з визначенням вмісту в крові хворих на хронічний коліт маркеру раннього оксидативного стресу - 8-ізопростану. Після проведеної корекції з застосуванням діоксиду церію спостерігається незначне зниження ВРП та ліпідної пероксидації у порівнянні з щурами, яким не проводилася корекція наночастинками. В існуючій науковій літературі ми не знайшли інформації щодо застосування наночастинок діоксиду церію саме в лікуванні запальних захворювань кишківника, хоча є інформація щодо їхнього застосування як потужних антиоксидантів. Після проведеної корекції наночастинками спостерігається незначне зниження ВРП та ліпідної пероксидації у порівнянні з щурами, яким не проводилася корекція.

До першої ланки антиоксидантного захисту відносять ензими - антиоксиданти, до яких відносять СОД, КТ, пероксидазу, зокрема глутатіонпероксидазу [7, 8]. СОД - це відомий антиоксидантний ензим, що перетворює високоактивний супероксидний аніон (О2-) у O_2 і H_2O_2 [9, 10]. У нашому дослідженні ми спостерігали підвищення активності ензиматичної ланки антиоксидантної системи, представленої СОД та КТ. На теперішній час існує інформація щодо ролі Nrf2, що є важливим транскрипційним фактором, сприяє збереженню слизової оболонки кишківника шляхом пригнічення інтенсивної генерації АФК при запальних захворюваннях кишківника та за нормальних умов секвеструється протеїном-інгібітором Keap1 [5]. Цей фактор контролює експресію ензимів-антиоксидантів – СОД, КТ, глутатіонпероксидази, гемоксигенази -1 [5, 11]. КТ перетворює перекис водню в пероксисомах на воду та кисень за фізіологічних умов. Однак, за умов патологічного стану пошкоджена пероксисома індукує оксидативний стрес, безпосередньо вивільняючи перекис водню [5, 12]. Таким чином, з одного боку, підвищення активності СОД та КТ в крові щурів з хронічним колітом спостерігається компенсаторно у відповідь на розвиток оксидативного стресу. З іншого боку, пошкоджена пероксисома вивільняє перекис водню з подальшою інтенсифікацією ВРП та ліпідної пероксидації, тобто виникає «порочне коло».

Висновки

В результаті проведених експериментальних досліджень було визначено, що у щурів з хронічним колітом, викликаним пероральним введенням декстрансульфат натрію, спостерігається розвиток оксидативного стресу, про що свідчить підвищення вмісту в крові щурів специфічного біохімічного маркеру - 8-ізопростану. У відповідь на ліпідну пероксидацію в організмі тварин визначається компенсаторне підвищення активності ензиматичної ланки антиоксидантної системи, зокрема супероксиддисмутази та каталази. Визначено позитивну дію перорального застосування наночастинок діоксиду церію на стан оксидантно-антиоксидантної системи. Спостерігали зниження біохімічного маркеру раннього оксидативного стресу – 8 ізопростану в крові щурів та незначне зниження активності ензимів антиоксидантного захисту.

Перспективи подальших досліджень

Хронічний коліт – це одна з найчастіших патологій в гастроентерології. Вивчення основних патогенетичних механізмів розвитку цього патологічного стану дасть змогу проводити ранню діагностику та корекцію. В перспективі досліджень – оцінка стану мембран лейкоцитів крові щурів з експериментальним колітом за допомогою флуоресцентних зондів.

Особистий внесок авторів

Бабенко О.В.: а) концепція та дизайн; б) збір та узагальнення даних; в) аналіз та інтерпретація результатів; г) написання рукопису.

Наконечна О.А.: а) концепція та дизайн; ґ) редагування рукопису; д) остаточне затвердження рукопису.

Конфлікт інтересів

Автори повідомляють про відсутність конфлкту інтересів.

References

1. Azer SA, Sun Y. Colitis. [Updated 2023 Aug 7]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 Jan. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK541037.
2. Wu Z, Liu L, He Ch, Xiao L, Yun D, Chen J, et al. 2024CD131 Contributes to Ulcerative Colitis Pathogenesis by Promoting Macrophage Infiltration. eLife. 2024 Nov;13:RP102637. doi: 10.7554/eLife.102637.1
3. Melgar S, Karlsson A, Michaelsson E. Acute colitis induced by dextran sulfate sodium progresses to chronicity in C57BL/6 but not in BALB/c mice: correlation between symptoms and inflammation. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2005;288(6):1328-1338. doi: 10.1152/ajpgi.00467.2004
4. Perše M, Cerar A. Dextran sodium sulphate colitis mouse model: traps and tricks. J Biomed Biotechnol. 2012;2012:718617. doi: 10.1155/2012/718617
5. Muro P, Zhang L, Li S, Zhao Z, Jin T, Mao F, et al. The emerging role of oxidative stress in inflammatory bowel disease. Front Endocrinol. 2024;15:1390351. doi: 10.3389/fendo.2024.1390351
6. Guan G, Lan S. Implications of antioxidant systems in inflammatory bowel disease. BioMed Res Int. 2018 May 9:2018:1290179. doi: 10.1155/2018/1290179
7. Xu J, Chu T, Yu T, Li N, Wang C, Li C, et al. Design of diselenide-bridged hyaluronic acid nano-antioxidant for efficient ROS

scavenging to relieve colitis. ACS Nano. 2022 Aug 23;16(8):13037-13048. doi: 10.1021/acsnano.2c05558
8. Gulcin, İ. Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. Arch Toxicol. 2020 Mar;94(3):651-715. doi: 10.1007/s00204-020-02689-3
9. Zheng M, Liu Y, Zhang G, Yang Z, Xu W, Chen Q. The Applications and Mechanisms of Superoxide Dismutase in Medicine, Food, and Cosmetics. Antioxidants (Basel). 2023 Aug 27;12(9):1675. doi: 10.3390/antiox12091675
10. Ighodaro OM, Akinloye OA. First line defence antioxidants - superoxidedismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. Alexandria J Med. 2017 Nov;54:287–93. doi: 10.1016/j.ajme.2017.09.001
11. Gerstgrasser A, Melhem H, Leonardi I, Atrott K, Schäfer M, Werner S, et al. Cell-specific activation of the nrf2 antioxidant pathway increases mucosal inflammation in acute but not in chronic colitis. J Crohn's Colitis. 2016;11:jjw172. doi: 10.1093/ecco-jcc/jjw172
12. Sandalio LM, Romero-Puertas MC. Peroxisomes sense and respond to environmental cues by regulating ROS and RNS signalling networks. Ann Bot. 2015 Sep;116(4):475-85. doi: 10.1093/aob/mcv074

Summary

STATE OF OXIDANT-ANTIOXIDANT SYSTEM IN RATS WITH EXPERIMENTAL COLITIS

Babenko O.V., Nakonechna O.A.

Key words: chronic colitis, 8-isoprostane, superoxide dismutase, catalase.

Introduction. Inflammatory diseases of the gastrointestinal tract: enterocolitis, acute and chronic colitis are among the most pressing problems of modern gastroenterology. The most urgent disease, the prevalence of which is increasing worldwide, is acute or chronic colitis, which is an inflammation of the colon mucosa.

The aim of the study was to determine the state of the oxidant system by the content of 8-isoprostane in the blood and the state of the enzymatic link of the antioxidant system by the activity of superoxide dismutase and catalase in the blood of intact animals and rats with experimental chronic colitis.

Materials and methods. The study involved 18 mature rats of both sexes from the WAG population, aged 4-5 months, weighing 225-240 g. All series of experiments were performed according to international principles of the European Convention for the Protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes (Strasbourg, 18.03.1986) and "General ethical principles of animal research" (Ukraine, 2001). The 8-isoprostane content and enzyme activity were determined by enzyme-linked immunosorbent assay.

Results. Currently, one of the most pressing issues in gastroenterology is identifying the key mechanisms underlying the pathogenesis of chronic colitis. A significant factor in the etiopathogenesis of this condition is the excessive formation of reactive oxygen species (ROS) and the subsequent development of oxidative stress. This oxidative imbalance contributes to dysregulated signal transmission, exerts a pro-inflammatory effect, and plays a crucial role in disease progression. One of the primary biochemical markers of lipid peroxidation and early oxidative stress is 8-isoprostane. In response to an increase in lipid peroxidation metabolites, the body's antioxidant defense system is activated to counteract the effects of free radicals and maintain redox balance. In this study, we evaluated the activity of key antioxidant enzymes, including superoxide dismutase (SOD) and catalase. In rats with chronic colitis, 8-isoprostane levels increased by 68.6%, SOD activity by 46.47%, and catalase activity by 95.1% compared to the intact group. These findings indicate the activation of the enzymatic arm of the antioxidant defense system in response to elevated lipid peroxidation, reflecting the body's attempt to mitigate oxidative damage.

Conclusion. After therapy with cerium dioxide nanoparticles, a decrease in the blood content of 8-isoprostane by 24.7% was observed compared with this indicator before correction, but it did not return to control values. There was also a decrease in both superoxide dismutase and catalase activity by about 22.0%.