



УДК 616.33/34-002-036.12-02:547.458.227.31-092.9-092.18:612.015.14

## СИСТЕМА ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ И АКТИВНОСТЬ АПОПТОЗА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ХРОНИЧЕСКОМ ГАСТРОЭНТЕРОКОЛИТЕ

**В.И. ЖУКОВ**  
**А.С. ТКАЧЕНКО**

*Харьковский национальный  
медицинский университет*

*e-mail: antontkachenko@mail.ru*

В эксперименте на крысах изучены показатели уровня перекисного окисления липидов (ПОЛ), активности апоптотических процессов и показателей функции эндотелия кишечника крыс с хроническим каррагинин-индуцированным гастроэнтероколитом. Установлено, что данное заболевание сопровождается активацией ПОЛ, нарушением микроциркуляции в кишечнике и активацией апоптотических процессов.

Ключевые слова: гастроэнтероколит, каррагинин, перекисное окисление липидов, апоптоз.

Каррагинин представляет собой высокомолекулярный анионный полимер, который получают путем экстракции из красных морских водорослей [1]. Каррагинин выполняет функцию природного гелеобразователя и загустителя в молочных, кондитерских и мясных продуктах. Пищевой каррагинин имеет средний молекулярный вес более 100кДа с небольшим процентом более мелких фрагментов. Данная пищевая добавка не разрушается в пищеварительном тракте и не всасывается. В экспериментальной медицине каррагинин широко применяется для моделирования воспалительных процессов. Так, в патологической физиологии каррагинин используют для моделирования перитонита, плеврита, артрита и каррагинин-индуцированного отека конечностей у крыс [2]. Каррагинин-индуцированное воспаление является острым, неиммунным и легко воспроизводимым. Отек, гипералгезия и эритема развиваются сразу после подкожной инъекции каррагинина и являются результатом действия таких провоспалительных агентов, как брадикинин, гистамин, тахикинины, компоненты системы комплемента, активные формы кислорода и азота [2]. Существуют данные про онкогенную трансформацию клеток под воздействием каррагинина – авторами найдена положительная корреляция между использованием продуктов с этой добавкой в диете и увеличением риска развития карциномы молочной железы [3]. Известна также модель язвенно-некротического каррагинин-индуцированного гастроэнтероколита [4]. В связи с этим возникает вопрос о безопасности применения каррагинина в качестве пищевой добавки. В современной литературе нет достоверных данных о влиянии систематического употребления каррагинина ни на организм взрослого человека, ни на организм ребенка, ни на организм плода при наличии данной добавки в рационе питания беременной женщины. В клинике изучение данной проблемы весьма сложно, поэтому возникает острая необходимость исследования влияния каррагинина на морфофункциональное состояние кишечника и метаболические показатели в условиях экспериментальной модели. В Харьковском национальном медицинском университете на базе модели язвенно-некротического каррагинин-индуцированного гастроэнтероколита разработана модель хронического каррагининового гастроэнтероколита средней степени тяжести, без язвенно-некротического процесса, путем использования более низких доз каррагинина (Патент на изобретение № 97322 от 25.01.12 «Спосіб моделювання хронічного гастроентероколіту»).

Установлено, что введение каррагинина приводит к повреждению энтероцитов кишечника. В то же время, неизученным остается механизм воздействия каррагинина на биомембраны энтероцитов при постоянном поступлении данного вещества в организм, что является весьма актуальной задачей ввиду широкого распространения продуктов питания, содержащих каррагинин, в рационе потребителя. Изучение механизмов повреждения биомембран позволит выработать регламентации по содержанию и использованию каррагинина в пищевых продуктах.

**Цель исследования.** Изучение уровня перекисного окисления липидов (ПОЛ), активности апоптотических процессов и показателей функции эндотелия кишечника крыс с экспериментальным хроническим гастроэнтероколитом.

**Материалы и методы.** Эксперимент проводили на 3-месячных крысах-самках линии Вистар, которые содержались в стандартных условиях вивария. Моделирование заболевания осуществлялось путем свободного доступа экспериментальных животных к 1% раствору каррагинина в питьевой воде, по методике разработанной в Харьковском национальном медицинском университете. Установлено, что развитие гастроэнтероколита начинается через 2 недели с момента начала приема раствора и прогрессирует в дальнейшем.



Через 4 недели животных выводили из эксперимента. 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). Активность протеинкиназы-1, регулирующей апоптогенный сигнал, определяли по методу Сумбаева [5]. Фрагментацию ДНК определяли спектрофотометрически по методу Галитовского [6]. Активность поли (АДФ-рибозы)-полимеразы (ПАРП) определяли по методу, основанному на электрофоретическом отделении поли-АДФ-рибозилированных гистоновых белков из ядер с последующим количественным определением в них поли-АДФ-рибозы [7]. Активность NO-синтаз определяли спектрофотометрически. Концентрацию малонового диальдегида определяли спектрофотометрическим методом по Федоровой [8], а диеновых конъюгатов по Гаврилову [9]. Уровень эндотелина-1 определяли иммуноферментным методом с помощью набора реактивов фирмы Amersham (Великобритания). Результаты исследования обрабатывались методами вариационной статистики с оценкой вероятности отличия по критерию Стьюдента-Фишера.

**Результаты и обсуждение.** Известно, что воспалительные процессы различного генеза сопровождаются активацией перекисного окисления липидов (ПОЛ). Ускорение процессов ПОЛ является одной из причин дестабилизации мембран и развития свободнорадикальной патологии [10]. На первой стадии процесса образуются диеновые конъюгаты жирных кислот (ДК). Из них в свою очередь образуются гидроперекиси липидов. При этом, продукты ПОЛ, вызывают конформационные изменения в липидном бислое мембран, что приводит к нарушению функции клеточных органелл. В местах присоединения перекисных радикалов жирные кислоты разрываются на фрагменты, на концах которых расположены альдегидные группы, обладающие высокой реакционной способностью. Если разрыв произошел с двух сторон, образуется малоновый диальдегид (МДА) [10].

Проведенные нами исследования показали, что у экспериментальных животных концентрация МДА увеличена в 2,5 раза по сравнению с контрольной группой, а уровень диеновых конъюгатов превышает в 2 раза аналогичный показатель контрольной группы (табл.1), что свидетельствует об активации свободнорадикальных процессов у животных с хроническим каррагенин-индуцированным гастроэнтероколитом.

Таблица 1

**Показатели перекисного окисления липидов в крови животных**

Группы животных	МДА(мкМ/г. белка)	ДК(мкМ/г. белка)
Контрольная	1,64±0,11	39,64±1,64
Гастроэнтероколит	3,82±0,19	64,72±3,02

Для оценки микроциркуляции кишечника определяли активность эндотелиальной и индуцибельной NO-синтаз, а также уровень эндотелина-1. Оксид азота (NO) является одним из наиболее важных биологических медиаторов, который вовлечен во множество физиологических и патофизиологических процессов. В частности, оксид азота участвует в реализации многих важных физиологических функций, таких как вазодилатация, нейротрансмиссия, снижение агрегации тромбоцитов, реакции иммунной системы, регуляция тонуса гладких мышц, состояние памяти и др., а также некоторых патологических процессов [11-12].

Изменение продукции оксида азота наблюдается при многих патологических процессах, в том числе при эндотоксическом шоке, диабете, ишемии/реперфузии миокарда, артериальной гипертензии. Синтез оксида азота катализируется NO-синтазами. Выделены три изофермента NO-синтазы: нейрональная NO-синтаза, индуцибельная NO-синтаза и эндотелиальная NO-синтаза. Эндотелиальная и индуцибельная NO-синтазы имеют отношение к продукции оксида азота в ранней фазе воспаления, при этом проявляются их провоспалительные эффекты. Поздняя фаза воспаления связана с локальной лейкоцитарной инфильтрацией, что обуславливает более важную роль оксида азота, синтезируемого лейкоцитарной индуцибельной NO-синтазой. Однако данные об эффекте NO, провоспалительном или противовоспалительном, неоднозначны, что отражается в разных моделях воспаления [13]. Нами установлено, что каррагениновый гастроэнтероколит сопровождается снижением активности как эндотелиальной, так и индуцибельной NO-синтаз.

Эндотелины – группа биологически активных пептидов широкого спектра действия, являющихся одним из важнейших регуляторов функционального состояния эндотелия. Их вазоконстрикторные эффекты сопровождаются изменениями системной и регионарной гемодинамики. Повышение уровня эндотелина наблюдается при сердечной недостаточности,



артериальной гипертензии, атеросклерозе, ишемической болезни сердца, аритмии [14]. При изучаемом заболевании отмечается повышение уровня эндотелина в гомогенате кишечника экспериментальных животных (табл.2).

Таблица 2

### Показатели функции эндотелия кишечника экспериментальных животных

Группы животных	Эндотелин-1 (пкг/г белка)	Эндотелиальная NO-синтаза (нмоль/г белка)	Индукцибельная NO-синтаза (нмоль/г белка)
Контрольная	2,34±0.22	0.744±0.023	0.165±0.012
Гастроэнтероколит	6.72±0.24	0.556±0.033	0.105±0.01

Таким образом, у экспериментальных животных наблюдается снижение активности NO-синтаз и повышение уровня эндотелина в гомогенате кишечника. Дисбаланс между вазоконстрикторами и вазодилататорами при хроническом каррагинин-индуцированном гастроэнтероколите указывает на наличие нарушений микроциркуляции и развитие эндотелиальной дисфункции.

В связи с выявленными нами морфологическими изменениями, а именно деэпителизацией ворсинок эпителия кишечника крыс из экспериментальной группы, интерес представляет изучение показателей апоптоза. Апоптоз – генетически запрограммированная форма гибели клетки, обеспечивающей клеточный гомеостаз в организме. Апоптоз поддерживает баланс между клеточной пролиферацией и клеточной смертью, а его нарушения ведут к развитию патологических состояний. Неоправданно низкий уровень апоптоза способен обеспечить выживание и накопление аномальных клеток, а повышение активности запрограммированной клеточной гибели ведет к развитию дегенеративных состояний. Для оценки выраженности апоптотических процессов при изучаемом заболевании были выбраны следующие показатели: активность протеинкиназы 1, регулирующей апоптогенный сигнал (ASK-1), поли(АДФ)-рибозы-полимеразы (ПАРП) и уровень фрагментации ДНК. Протеинкиназа, регулирующая апоптогенный сигнал активируется в ответ на окислительный стресс, стресс эндоплазматической сети и повышенное поступление ионов кальция в клетку, запущая при этом MAP-киназный каскад, что приводит к активации каспаз [15].

ПАРП – фермент репарации ДНК [16]. Каспазы, активирующиеся при апоптозе, расщепляя инактивируют ПАРП, предотвращая репарацию расщепляемой ДНК.

Фрагментация ДНК представляет собой ее межнуклеосомную деградацию, с формированием фрагментов, содержащих 180 пар нуклеотидов и является терминальной фазой апоптоза. Причинами фрагментации являются разрушение топоизомеразы II и гистона H1 каспазами.

Повышение активности ASK-1 в гомогенате кишечника экспериментальных животных, наряду со снижением активности ПАРП и повышением уровня фрагментации ДНК в клетках кишечника указывают на активацию апоптоза в кишечнике крыс с хроническим экспериментальным каррагинин-индуцированным гастроэнтероколитом.

Таблица 3

### Показатели активности апоптоза в кишечнике экспериментальных животных

Группы животных	Протеинкиназа-1, регулирующая апоптогенный сигнал (ед/мин. мг белка)	Поли(АДФ)-рибоза-полимераза (мкмоль/мг белка)	Фрагментация ДНК %
Контрольная	1.77±0.09	1.37±0.02	15.8±1.0
Гастроэнтероколит	4.43±0.19	0.46±0.02	23.9±0.9

**Выводы.** Регулярное введение каррагенана в дозах меньших, чем содержится данного вещества во многих продуктах питания, приводит к развитию гастроэнтероколита (ГЭК). В механизмах развития ГЭК важную роль играет нарушение микроциркуляции в кишечнике, о чем свидетельствуют изменения активности NO-синтаз и содержания эндотелина. В патогенезе ГЭК важную роль играет активация апоптотических процессов, которые формируются на фоне развития эндотелиальной дисфункции.

### Литература

1. Borthakur A. Carrageenan induces interleukin-8 production through distinct Bcl10 pathway in normal human colonic epithelial cells / A. Borthakur, S. Bhattacharyya, P.K. Dudeja [et al.] // Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. – 2007. – Vol. 292 (3). – С. 829-838.



2. Christopher J. Morris. Carrageenan-Induced Paw Edema in the Rat and Mouse / Christopher J. Morris / *Inflammation Protocols*. – 2003. – № 225. – P. 115-121.
3. Tobacman J.K. Consumption of carrageenan and other water-soluble polymers used as food additives and incidence of mammary carcinoma / J.K. Tobacman, R.B. Wallace, M.B. Zimmerman / *Med. Hypotheses*. – 2001. – Vol. 56 (5) – P. 589-598.
4. Victor E. Pricolo, Shirley V. Madhere, Sidney D. Finkelstein, Jonathan S. Reichner. // *Journal of surgical research*. – 1996. – Vol. 66. – P.6-11.
5. Сумбаев, В.В. // *Биол. Эксп. Мед.* – 2001, – 131. -№ 2.- с. 95-100.
6. Галитовский, В.Е. Ингибиторы энергетики митохондрий предотвращают межнуклеосомную фрагментацию ДНК в тимocyтах / В.Е. Галитовский, В.Г. Гогвадзе // *Биохимия*. – 1998. – вып. 12. – С. 1616-1620.
7. Sumbayev V.V., Yasinska I.M., Kosanov A.Y. // *Biochem. Soc. Trans.* – 2000. – 28 (№5). – p.335.
8. Федорова, Т.К. Реакция с ТБК для определения МДА крови методом флюориметрии / Т.К. Федорова, Т.С. Корпунова, Э.Т. Ларская // *Лаб. дело*. – 1983. – № 3, С. 25-28.
9. Гаврилов, Б.В. СФ-метрическое определение содержания ГПЛ в плазме крови / Б.В. Гаврилов, М.И. Мишкородная // *Лаб. дело*. – 1983. – № 3, С. 33-36.
10. Владимиров, Ю.А. Роль нарушений свойств липидного слоя мембран в развитии патологических процессов / Ю.А. Владимиров // *Патол. физиология и эксперим. терапия*. – 1989. – № 4. – С. 7-19.
11. Anne R. Crecelius Mechanisms of ATP-mediated vasodilation in humans: modest role for nitric oxide and vasodilating prostaglandins / Anne R. Crecelius, Brett S. Kirby, Jennifer C. Richards [et al.] // *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* – 2011. – Vol. 301 (4) – P. 1302-1310.
12. Zamora R. Inducible nitric oxide synthase and inflammatory diseases / R. Zamora, V. Vodovotz, T.R. Billiar / *Molec. Med.* – 2000. – Vol. 6, № 5. – P. 347-373.
13. Лугай, М.І. Концентрація ендотеліну-1 в плазмі крові корелює з вираженістю клінічних проявів стабільної стенокардії напруження / М.І. Лугай, В.А. Слободський, Т.І. Гавриленко // *Укр. мед. часопис*. – 2004. – Т. 42, № 4. – С. 105-108.
14. Munter K. The role of endothelin receptor antagonists in cardiovascular pharmacotherapy. / K. Munter, M. Kirchengast // *Expert. Opin. Emerg. Drugs*. – 2001. – Vol. 6. – P. 3-11.
15. Hattori K. The roles of ASK family proteins in stress responses and diseases / K. Hattori, I. Naguro, C. Runchel [et al.] // *Cell Commun. Signal*. – 2009. – № 24 – P. 7-9.
16. Сумбаев, В.В. Активность протеникиназы, регулирующей апоптогенный сигнал 1, поли-(адф-рибоза)-полимеразы и межнуклеосомная фрагментация ДНК в печени крыс в условиях оксидативного стресса, вызванного хлоридом кобальта / В.В. Сумбаев // *Бюл. экс. биол. и мед.* -2001. – № 2. – С. 148-149.

## **LIPID PEROXIDATION SYSTEM AND ACTIVITY OF APOPTOSIS IN EXPERIMENTAL CHRONIC GASTROENTEROCOLITIS**

**V.I. ZHUKOV**  
**A.S. TKACHENKO**

*Kharkiv National  
Medical University*

*e-mail: antontkachenko@mail.ru*

Indices of lipid peroxidation, the activity of apoptotic processes and indices of endothelial function of the intestine of rats with chronic carrageenan-induced gastroenterocolitis were studied in the experiment. It was found that the disease was accompanied by activation of lipid peroxidation, disorder of microcirculation in intestine and activation of apoptotic processes.

Keywords: gastroenterocolitis, carrageenan, lipid peroxidation, apoptosis.