

**УРОВЕНЬ VEGF и ФНО- $\alpha$  ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ КАРРАГЕНАН-ИНДУЦИРОВАННОМ ГАСТРОЭНТЕРОКОЛИТЕ****Харьковский национальный медицинский университет (г. Харьков)**

Результаты, представленные в статье, получены в ходе выполнения НИР «Вивчення віддалених наслідків регулярного споживання харчових продуктів, що містять генетично модифіковані організми, в умовах пошкодження епітеліального бар'єру шлунково-кишкового тракту», № государственной регистрации 0110 U000653.

**Вступление.** В последние годы количество продуктов, содержащих пищевые добавки, увеличивается, а вопросы безопасности их употребления остаются открытыми. Установлено, что систематическое употребление некоторых пищевых добавок является фактором риска развития хронических заболеваний желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), и в настоящее время интенсивные усилия направлены на изучение вклада различных специфических компонентов диеты в этиологию данных заболеваний [9, 11]. В обширном ряду всевозможных пищевых добавок, наше внимание привлекла пищевая добавка E407, известная как каррагенан. Каррагенаны представляют собой сульфатированные полисахариды красных водорослей (*Gigartina*, *Chondrus*, *Eucheuma*) [2], из которых они экстрагируются и в дальнейшем используются в пищевой промышленности для улучшения текстуры продуктов питания в качестве загустителя, стабилизатора и эмульгатора. Каррагенаны добавляют в молочные, заправки салатов, соевое молоко, детское питание, мясную продукцию, хлебобулочные и кондитерские изделия [4, 5]. Каррагенан также используется в экспериментальной медицине для моделирования воспалительных процессов, в том числе и ЖКТ [8, 12]. Количество опубликованных работ по каррагенану растет, за 2012 год в печати вышло около 500 статей посвященных данной теме. Большинство этих работ посвящено изучению влияния противовоспалительных средств на каррагенан-индуцированное воспаление, но при этом без уточнения механизмов индукции и развития каррагенанового воспаления. В Харьковском национальном медицинском университете разработана модель хронического каррагенанового гастроэнтероколита средней степени тяжести (Патент на изобретение №97322 от 25.01.12 «Спосіб моделювання хронічного гастроентероколіту»), которая позволяет изучать особенности интестинального каррагенанового воспаления у экспериментальных животных.

В настоящее время установлено наличие тесной связи между хроническим воспалением и процессами ангиогенеза [3]. Сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF – vascular endothelial growth factor) является наиболее важным цитокином, влияющим на дифференцировку клеток эндотелия, их миграцию, пролиферацию и образование сосудов [1]. VEGF обеспечивает выход из сосудов плазменных белков (фибронектина, витронектина, фибриногена, факторов коагуляции) и активирует экспрессию тканевого фактора (клеточный инициатор коагуляции крови), что ведет к формированию зацепок для мигрирующих эндотелиальных и гладкомышечных клеток. После образования новых сосудов фактор VEGF выступает как фактор выживаемости и подавляет апоптоз эндотелиоцитов [6]. В нескольких работах продемонстрирована повышенная экспрессия VEGF в тканях кишечника человека при интестинальном воспалении [7, 10], однако роль данного цитокина в патогенезе каррагенан-индуцированного воспаления кишечника остается невыясненной.

**Целью работы** явилось изучение уровня VEGF и ФНО- $\alpha$  в сыворотке крови крыс с экспериментальным хроническим каррагенан-индуцированным гастроэнтероколитом (ГЭК).

**Объект и методы исследования.** 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, принимавших пищевую добавку каррагенан в течение 2 недель. Вторая группа включала в себя крыс, которые употребляли каррагенан в течение 4 недель. Контрольная группа состояла из интактных здоровых животных. Моделирование заболевания осуществлялось путем свободного доступа экспериментальных животных к 1% раствору каррагина в питьевой воде. Установлено морфологически и биохимически (Патент на изобретение №97322 от 25.01.12 «Спосіб моделювання хронічного гастроентероколіту»), что развитие гастроэнтероколита начинается через 2 недели с момента начала приема раствора и прогрессирует в дальнейшем. 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). Уровни VEGF и ФНО- $\alpha$  в сыворотке крови определяли иммуноферментным методом с помощью наборов реактивов фирмы «Вектор БЕСТ» (Новосибирск, Российская Федерация). Статистическую обработку данных проводили 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  $p < 0,05$ . Для оценки степени корреляционной зависимости использовали рассчитанный с помощью программы GraphPad Prism 5 коэффициент Спирмена.

**Результаты исследований и их обсуждение.**

Определение уровня VEGF в крови экспериментальных животных через две недели после начала приема каррагенана продемонстрировало повышение уровня данного цитокина в сыворотке крови крыс первой группы по сравнению с животными контрольной группы, однако обнаруженные изменения оказались недостоверными ( $p = 0,1758$ ). При развитии хронического каррагенан-индуцированного воспаления кишечника уровень VEGF в крови экспериментальных животных достоверно повышается более чем в 2 раза по сравнению с аналогичным показателем у крыс группы контроля через месяц после начала приема каррагенана (табл. 1).

Поскольку VEGF является признанным молекулярно-биологически маркером неоангиогенеза, повышение данного показателя в крови животных с хроническим каррагенан-индуцированным ГЭКом указывает на стимуляцию процессов неоангиогенеза при хронизации и прогрессировании заболевания. По-видимому, роль VEGF при хроническом каррагенан-индуцированном воспалении кишечника связана с формированием новых сосудов в месте повреждения, а также VEGF-зависимым увеличением проницаемости кровеносных сосудов и увеличением экспрессии белков адгезии лейкоцитами.

Экспрессия VEGF стимулируется значительным количеством проангиогенных факторов, в первую очередь цитокинами. Известно, что ФНО- $\alpha$  стимулирует экспрессию VEGF. Нами изучено содержание ФНО- $\alpha$  в сыворотке крови экспериментальных животных. Установлено, что уровень данного цитокина достоверно повышен в 5,5 раз по сравнению с аналогичным показателем в контрольной группе через две недели после начала приема подопытными животными каррагенана. Четырехнедельный прием каррагенана приводит к более выраженному повышению уровня ФНО- $\alpha$  (табл. 2). Проведенный корреляционный анализ установил наличие сильной положительной корреляционной связи ( $r = 0,829$ ) между уровнями ФНО- $\alpha$  и VEGF через две недели

Таблица 1

**Показатели уровня VEGF в крови животных**

Группы животных	VEGF мкг/мл
Контрольная (n = 10)	32, 89 ± 4. 194
Гастроэнтероколит 2 недели (n = 10)	48,56 ± 8. 484 p = 0. 1758
Гастроэнтероколит 4 недели (n = 10)	73,58 ± 3. 818 p < 0. 0001

Таблица 2

**Показатели уровня ФНО- $\alpha$  в крови животных**

Группы животных	ФНО- $\alpha$ (пг/мл)
Контрольная (n = 10)	4,135 ± 0. 7041
Гастроэнтероколит 2 недели (n = 10)	23,55 ± 3. 661 p = 0. 0004
Гастроэнтероколит 4 недели (n = 10)	29,47 ± 5. 235 p = 0. 0007

после начала использования каррагенана. При этом через 4 недели после начала приема E407 корреляция снижается ( $r = 0,57$ ), что свидетельствует о действии на продукцию VEGF в меньшей степени ФНО- $\alpha$ , а в большей – других сигнальных молекул.

VEGF представляет собой мощный активатор эндотелиальных клеток и является критическим фактором индукции ангиогенеза при развитии воспаления кишечника. Важность VEGF для регуляции ангиогенеза и сосудистого ремоделирования обуславливает интерес к изучению данных показателей при воспалениях кишечника различного генеза, в том числе при каррагенан-индуцированном ГЭК.

**Выводы.**

1. Хронический каррагенан-индуцированный ГЭК сопровождается повышением VEGF в сыворотке крови экспериментальных животных, что указывает на активацию процессов неоангиогенеза при каррагенановом воспалении кишечника.

2. Динамика изменений содержания VEGF при прогрессировании заболевания соответствовала изменению уровня ФНО- $\alpha$ , что свидетельствует о стимулирующем действии ФНО- $\alpha$  на продукцию VEGF.

3. Влияние ФНО- $\alpha$  на синтез VEGF максимально выражено на ранних стадиях хронизации каррагенан-индуцированного интестинального воспаления.

**Перспективы дальнейших исследований.**

Полученные нами данные обосновывают перспективу дальнейших исследований, направленных на изучение влияния пищевой добавки каррагенан на желудочно-кишечный тракт экспериментальных животных с целью предупреждение его негативного влияния на здоровье людей.

**Литература**

1. Герштейн Е. С. Биологические маркеры рака молочной железы : методологические аспекты и клинические рекомендации / Е. С. Герштейн, Н. Е. Кушлинский // Маммология. – 2005. – № 1. – С. 65-69.
2. Соколова Е. В. Изучение *in vitro* и *ex vivo* антиоксидантной активности каррагинанов – сульфатированных полисахаридов красных водорослей / Е. В. Соколова, А. О. Барабанова, В. А. Хоменко // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2010. – Т. 150, № 10. – С. 398-401.

3. Angelo L. S. Vascular endothelial growth factor and its relationship to inflammatory mediators / L. S. Angelo, R. Kurzrock // Clin. Cancer Res. – 2007. – Vol. 13, № 10. – P. 2825-2830.
4. Bonizzi G. The two NF- $\kappa$ B activation pathways and their role in innate and adaptive immunity / G. Bonizzi, M. Karin // Trends. Immunol. – 2004. – № 25. – P. 280-288.
5. Calvert R. J. Alterations in colonic thymidine kinase enzyme activity induced by consumption of various dietary fibers / R. J. Calvert, M. Reicks // Proc. Soc. Exp. Biol. Med. – 1988. – Vol. 189. – P. 45-51.
6. Freedman S. B. Therapeutic Angiogenesis for Coronary Artery Disease / S. B. Freedman, Jeffrey M. Isner // Ann. Intern. Med. – 2002. – Vol. 132. – P. 54-71.
7. Koutroubakis I. E. Role of angiogenesis in inflammatory bowel disease / I. E. Koutroubakis, G. Tsiolakidou, K. Karmiris // Inflamm. Bowel. Dis. – 2006. – № 12. – P. 515-523.
8. Pricolo V. E. Effects of lambda-carrageenan induced experimental enterocolitis on splenocyte function and nitric oxide production / V. E. Pricolo, S. M. Madhere, S. D. Finkelstein // J. Surg. Res. – 1996. – Vol. 66, № 1. – P. 6-11.
9. 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.
10. Scaldaferrri F. VEGF-A links angiogenesis and inflammation in inflammatory bowel disease pathogenesis / F. Scaldaferrri, S. Vetrano, M. Sans // Gastroenterology. – 2009. – Vol. 136. – P. 585-595.
11. Schottenfeld D. Cancers of the large intestine. / D. Schottenfeld, S. J. Winawer // Cancer Epidemiology and Prevention 2nd ed. New York : Oxford University Press. – 1996. – P. 813-840.
12. Tobacman J. K. Review of harmful gastrointestinal effects of carrageenan in animal experiments / J. K. Tobacman // Environmental Health Perspectives. – 2001. – Vol. 109, № 10. – P. 983-994.

УДК 616. 33/. 34-002. 2-02:582. 273]-074

### УРОВЕНЬ VEGF ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ КАРРАГЕНАН-ИНДУЦИРОВАННОМ ГАСТРОЭНТЕРОКОЛИТЕ

Ткаченко А. С.

**Резюме.** В эксперименте изучены показатели уровня VEGF и ФНО- $\alpha$  в сыворотке крови крыс с хроническим каррагенан-индуцированным гастроэнтероколитом. Установлено, что данное заболевание сопровождается повышением уровня VEGF, что позволяет сделать вывод об активации ангиогенеза при каррагенановом воспалении кишечника. Динамика изменений содержания VEGF при прогрессировании заболевания соответствовала изменениям уровня ФНО- $\alpha$ , что свидетельствует о стимулирующем действии ФНО- $\alpha$  на продукцию VEGF.

**Ключевые слова:** гастроэнтероколит, каррагенан, VEGF, ангиогенез, ФНО- $\alpha$ .

УДК 616. 33/. 34-002. 2-02:582. 273]-074

### РІВЕНЬ VEGF ПРИ ХРОНІЧНОМУ КАРАГЕНАН-ІНДУКОВАНОМУ ГАСТРОЕНТЕРОКОЛІТІ

Ткаченко А. С.

**Резюме.** В експерименті вивчено показники рівня VEGF та ФНП- $\alpha$  в сироватці крові щурів з хронічним карагенан-індукованим гастроентероколітом. Встановлено, що дане захворювання супроводжується підвищенням рівня VEGF, що дозволяє зробити висновок про активацію ангиогенезу при карагенановому запаленні кишечника. Динаміка змін вмісту VEGF при прогресуванні захворювання відповідала змінам рівня ФНП- $\alpha$ , що свідчить про стимулюючий вплив ФНП- $\alpha$  на продукцію VEGF.

**Ключові слова:** гастроентероколіт, карагенан, VEGF, ангиогенез, ФНП- $\alpha$ .

UDC 616. 33/. 34-002. 2-02:582. 273]-074

### The Level of Vegf in Experimental Chronic Carrageenan-Induced Gastroenterocolitis

Tkachenko A. S.

**Summary.** Nowadays the amount of food products containing food additives has been significantly increased. It has been established that the consumption of some food additives can lead to the development of chronic inflammatory diseases of the gastrointestinal tract. Our attention is paid to food additive E407, also known as carrageenan. Carrageenans are sulfated polysaccharides extracted from red seaweeds and used as thickeners and stabilizers in food industry. The model of chronic carrageenan-induced gastroenterocolitis was elaborated (Патент на изобретение №97322 от 25. 01. 12 «Спосіб моделювання хронічного гастроентероколіту») which allowed studying the features of carrageenan-induced intestinal inflammation in rats.

The processes of chronic inflammation and neoangiogenesis are tightly linked with each other. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is the main cytokine that influences differentiation, migration and proliferation of endothelial cells leading to the formation of new vessels. The increased expression of VEGF in intestine in intestinal inflammation has been reported in several articles, but role of this cytokine in carrageenan-induced intestinal inflammation is poorly understood.

The research was performed to study the levels of VEGF and tumour necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) in blood serum of rats with chronic carrageenan-induced gastroenterocolitis.

The female Wistar rats were used for the experiment. Chronic carrageenan-induced gastroenterocolitis was reproduced by the free access of animals to 1% solution of carrageenan in drinking water. Laboratory animals were divided into 3 groups. Group № 1 consisted of experimental animals, who consumed food additive carrageenan

during 2 weeks. Group №2 consisted of experimental animals, who consumed food additive carrageenan during one month and group №3 consisted of intact animals. The development of gastroenterocolitis was proved morphologically and biochemically. Manipulations with animals were carried out in accordance with the provisions of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes (Strasbourg, 1986). The levels of VEGF and TNF- $\alpha$  in blood serum of animals were measured by ELISA.

The level of VEGF in blood serum of rats was significantly increased after one month of carrageenan intake compared to control group. It indicated the stimulation of neovascularization during chronization and progression of the disease.

The role of VEGF in carrageenan-induced gastroenterocolitis might be linked with formation of new vessels and stimulation of VEGF-dependant permeability of blood vessel at the site of inflammation.

The level of TNF- $\alpha$  was 5.5 times higher compared to control group after two weeks of carrageenan consumption and 6 times higher after one month. The positive strong correlation ( $r=0.829$ ) was observed between levels of VEGF and TNF- $\alpha$  in blood serum after 2 weeks of carrageenan intake. The correlation slightly decreased ( $r=0.57$ ) after one month of carrageenan consumption.

Obtained data allow to presume that chronic carrageenan-induced gastroenterocolitis is accompanied by elevation of VEGF concentration in blood serum of experimental animals, which indicates the activation of neoangiogenesis in intestine of rats. The changes of VEGF level during the progression of the disease are similar to changes of TNF- $\alpha$  concentration. The TNF- $\alpha$  is supposed to stimulate expression of VEGF in carrageenan-induced intestinal inflammation. The influence of TNF- $\alpha$  on VEGF production is mainly observed in early stages of chronization of carrageenan-induced gastroenterocolitis.

**Key words:** gastroenterocolitis, carrageenan, VEGF, angiogenesis, TNF- $\alpha$ .

*Рецензент – проф. Жуков В. І.*

**Стаття надійшла 12. 09. 2013 р.**