

СТАН ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ ПРИ ХРОНІЧНОМУ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ ГАСТРОЕНТЕРОКОЛІТІ

Харківський національний медичний університет (м. Харків)

Результати, що презентовані у статті, були отримані у ході проведення НДР «Вивчення віддалених наслідків регулярного споживання харчових продуктів, що містять генетично модифіковані організми, в умовах пошкодження епітеліального бар'єру шлунково-кишкового тракту», № державної реєстрації 0110 U000653.

Вступ. В останні роки спостерігається збільшення кількості хворих гастроентерологічного профілю, при цьому в структурі захворюваності намічається тенденція до почастішання випадків виникнення хронічних запальних захворювань кишечника (ХЗЗК) [4]. ХЗЗК, до яких відноситься хвороба Крона (ХК) та виразковий коліт (ВК), найбільш часто зустрічаються в індустріально розвинених країнах Північної Європи та Північної Америки [4]. Важливо відзначити, що пік захворюваності ХЗЗК припадає на вікову групу від 20 до 40 років, що обумовлює високу соціальну значимість цієї проблеми. Встановлено, що особливості сучасного харчування можуть розглядатися в якості можливого джерела розвитку запальних захворювань кишечника, і в даний час інтенсивні зусилля спрямовані на вивчення внеску різних специфічних компонентів дієти у розвиток ХЗЗК. [13, 14]. Особлива увага приділяється вивченню ролі різних харчових добавок у якості етіологічних факторів запальних захворювань шлунково-кишкового тракту (ШКТ). У великому ряду всіляких харчових добавок, увагу привернула харчова добавка Е407, відома як карагенан. Карагенани – сульфатовані полісахариди червоних водоростей, які використовуються у харчовій промисловості як агенти гелеутворювачів та загусників [8]. Непрямий доказ зв'язку між вживанням карагенану і поширеністю виразкового коліту складається у схожому географічному розподілі між високим рівнем споживання карагенану в харчуванні і високою поширеністю ХЗЗК. Виразковий коліт широко поширений в Північній Америці, Сполученому Королівстві, країнах Скандинавії, і менш поширений у Центральній і Південній Європі, Азії та Африці [12]. Ця особливість розподілу виразкового коліту схожа з високим рівнем споживання карагенану, що забезпечує доказову базу потенційної етіологічної ролі карагенану у захворюваннях людини [11], але механізми розвитку карагенан-індукованого запалення ШКТ залишаються невідомими. Відомо, що довготривале вживання карагенану викликає розвиток

хронічного гастроентероколіту (ГЕК) у щурів [7]. Дана модель хронічного карагенан-індукованого ГЕК середнього ступеня тяжкості дозволяє вивчати особливості розвитку карагенанового запалення ШКТ, зокрема стан прооксидантно-антиоксидантної системи.

Метою дослідження було вивчення особливостей функціонування прооксидантно-антиоксидантної системи у щурів з хронічним карагенан-індукованим ГЕК.

Об'єкт і методи дослідження. Експеримент проводили на 30 статевозрілих щурах лінії Вістар, які містилися в стандартних умовах віварію. Тварини були розділені на 3 групи. Перша група включала в себе 10 лабораторних тварин, які вживали харчову добавку карагенан щодня протягом 2 тижнів. Друга група складалася з 10 щурів, які вживали карагенан протягом 4 тижнів. Третя група була контрольною та складалася з 10 інтактних здорових тварин. Моделювання захворювання здійснювалося шляхом вільного доступу експериментальних тварин до 1% розчину карагенану у питній воді [7]. Розвиток гастроентероколіту через два тижні після початку прийому карагенану підтверджено морфологічно і біохімічно. Утримання тварин та маніпуляції над ними проводили відповідно до положень Європейської конвенції «Про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986). Концентрацію ТБК (тіобарбітурова кислота)-активних продуктів – малонного діальдегіду (МДА) [9] та дієнових кон'югатів (ДК) [2], активність супероксиддисмутази (СОД) та каталази у сироватці крові, загальну антиоксидантну активність (ЗАА) сироватки крові визначали спектрофотометричним методом [5, 6]. Для визначення продуктів окисної модифікації білків (ОМБ) використовували метод Е. Е. Дубініної та співавт. [3]. Статистичну обробку даних проводили за допомогою програми GraphPad Prism 5. Для виявлення розбіжностей між незалежними групами нормально розподілених величин використовували Т-критерій Стьюдента-Фішера; відмінності між групами вважали статистично достовірними при $p < 0,05$.

Результати досліджень та їх обговорення. При наявності в організмі будь-яких патологічних процесів одним з найбільш значущих інтегральних показників стану метаболізму є інтенсивність

Таблиця 1

Показники перекисного окислення ліпідів та рівень карбонільованих білків у крові експериментальних тварин (M ± m)

Показники	Тварини контрольної групи	Тварини з ГЕК, що вживали карагенан протягом 2 тижнів	Тварини з ГЕК, що вживали карагенан протягом 4 тижнів
	n = 10	n = 10	n = 10
Малоновий діальдегід, мкМ / г. білка	1,64 ± 0,0376	6,470 ± 0,156 p < 0,0001	3,820 ± 0,0448 p < 0,0001
Дієнові кон'югати, мкМ / г. білка	39,64 ± 0,4207	103,2 ± 1,872 p < 0,0001	64,71 ± 1,173 p < 0,0001
Карбонільовані білки, мкмоль / л	0,21 ± 0,002	0,81 ± 0,044 p < 0,0001	0,62 ± 0,041 p < 0,0001

Таблиця 2

Показники активності ферментів антиоксидантної системи та рівень загальної антиоксидантної активності крові експериментальних тварин (M ± m)

Показники	Тварини контрольної групи	Тварини з ГЕК, що вживали карагенан протягом 2 тижнів	Тварини з ГЕК, що вживали карагенан протягом 4 тижнів
	n = 10	n = 10	n = 10
Каталаза, мккат/г Нв	3,11 ± 0,022	6,44 ± 0,48 p < 0,0001	4,35 ± 0,24 p < 0,0001
Супероксид-дисмутаза, U/мл. хв.	2,09 ± 0,16	3,97 ± 0,20 p < 0,0001	2,74 ± 0,11 p < 0,0001
Загальна антиоксидантна активність, од/мл	1,85 ± 0,0251	1,88 ± 0,0289 p > 0,05	0,71 ± 0,0457 p < 0,0001

вільнорадикальних процесів, і, перш за все, перекисного окислення ліпідів (ПОЛ). ТБК-активні продукти є найбільш інформативними показниками наявності активації ПОЛ, визначення яких і було обрано для оцінки рівня ліпідної пероксидації при хронічному карагенан-індукованому ГЕК.

Встановлено, що у тварин, що вживали карагенан, в сироватці крові достовірно підвищується рівень ТБК-активних продуктів, в порівнянні з тваринами контрольної групи. При цьому більш виражені зміни даних показників ПОЛ характерні для двотижневого вживання карагенану. Проведені дослідження показали, що через два тижні прийому карагенану рівень МДА в крові експериментальних тварин в 4 рази перевищує показники контрольної групи, а при чотиритижневому вживанні даної харчової добавки перевищує аналогічний показник у щурів контрольної групи в 2,5 рази (табл. 1). Схожа динаміка змін характерна і для концентрації ДК в крові щурів з хронічним ГЕК. Двотижнєве вживання карагенану призводить до підвищення рівня ДК у крові експериментальних тварин в 2,6 рази. При подальшому розвитку захворювання рівень ДК знижується, не досягаючи, однак показників контрольної групи (табл. 1). Подібні результати свідчать про активацію вільнорадикальних процесів, що обумовлено генерацією активних форм кисню (АФК), і процесів ліпідної пероксидації при карагенан-індукованому ГЕК. При цьому більш виражені зміни характерні для ранніх стадій хронічного карагенан-індукованого інтестинального запалення. Відомо, що генерація АФК ентероцитами кишечника стимулюється безпосередньо карагена-ном [10], що може свідчити про значну роль вільнорадикальних процесів в ініціації запалення при хронічному карагенан-індукованому ГЕК.

Відносно новим напрямком для оцінки стану вільнорадикальних процесів є дослідження ОМБ [1]. З метою розширення існуючих уявлень про роль вільнорадикальних процесів у розвитку карагенан-індукованого ГЕК були вивчені особливості накопичення карбонільованих білків в сироватці крові експериментальних тварин. Встановлено, що розвиток карагенан-індукованого ГЕК супроводжується підвищенням вмісту продуктів ОМБ у сироватці крові. Так через 2 тижні після початку вживання карагенану вміст карбонільованих білків у сироватці крові лабораторних тварин достовірно підвищується у 3,9 рази при порівнянні з показниками контрольної групи. Рівень карбонільованих білків у

сироватці крові тварин 2-ої групи, які вживали карагенан протягом 4 тижнів, перевищує аналогічний показник контрольної у 3 рази (табл. 1). Отож, при подальшому прогресуванні захворювання спостерігається незначне зниження показника вмісту карбонільованих білків, при порівнянні з більш ранньою стадією хронічного ГЕК, але вміст продуктів ОМБ значно перевищує показники контрольної групи. Таким чином, можна зробити висновки про наявність карбонільного стресу при розвитку хронічного карагенан-індукованого ГЕК, який більш виражений при 2-х тижневому вживанні карагенану. Карбонільний стрес обумовлений активацією вільно радикальних процесів та процесів ліпідної пероксидації, оскільки динаміка змін вмісту карбонільованих білків у сироватці крові при прогресуванні захворювання відповідає динаміці змін вмісту продуктів ПОЛ – ТБК-активних сполук.

Продукти ПОЛ становлять небезпеку для організму лише у разі порушення функціонування антиоксидантної системи (АОС) або виснаження її резервних можливостей, що обумовило необхідність вивчення параметрів АОС при розвитку карагенан-індукованого ГЕК. Для оцінки стану АОС були вибрані показники ЗАА сироватки крові, а також активність ферментів першого рівня антиоксидантного захисту – каталази та СОД.

Встановлено, що активність каталази сироватки крові щурів, що вживали карагенан протягом 2 тижнів, достовірно

підвищується у 2,1 рази у порівнянні з контрольною групою. В той же час, у щурів 2-ої групи активність каталази достовірно збільшена у 1,4 рази у порівнянні з аналогічним показником контрольної групи. Схожа динаміка змін показника при прогресуванні хронічного ГЕК характерна і для активності СОД. У ході проведення роботи встановлено, що активність СОД при 2-тижневому прийомі карагенану достовірно вище (у 1,9 рази) у порівнянні з контрольною групою (**табл. 2**). При подальшому прогресуванні захворювання активність СОД знижується, але не досягає рівня активності контрольної групи. При 4-тижневому вживанні карагенану активність СОД у сироватці крові експериментальних щурів достовірно підвищена (у 1,3 рази) у порівнянні з контрольною групою (**табл. 2**).

Таким чином, високий рівень каталази та супероксиддисмутази активності сироватки крові тварин всіх експериментальних груп та тенденцію до його зниження при подальшому прогресуванні захворювання, однак не до рівня активності сироватки крові щурів контрольної групи, можна розглядати як позитивний ефект, що направлений на адаптацію експериментальних тварин до дії карагенану і свідчить про часткову компенсацію захворювання.

Встановлено, що двотижневий прийом карагенану не приводить до достовірних змін показника ЗАА. Однак, показник ЗАА у експериментальних тварин, що вживали карагенан протягом 4 тижнів знижений в 2,6 рази в порівнянні з аналогічним показником щурів контрольної групи (**табл. 2**), що свідчить про пригнічення антиоксидантної системи. Отож, підвищена активність СОД і каталази сироватки крові у щурів 1-ої групи у поєднанні з незмінною ЗАА сироватки крові свідчить про розвиток компенсаторної реакції у щурів на знайденому у ході експерименту активацію вільнорадикальних процесів, яка однак не є сильно вираженою.

У експериментальних тварин другої групи спостерігається достовірна супресія антиоксидантної активності сироватки крові, про що свідчить різке зниження ЗАА крові, яка спостерігається разом з незначним статистично значущим підвищенням активності антиоксидантних ферментів каталази та

СОД. Подібні зміни можуть бути обумовлені домінуванням каталазно-супероксиддисмутази ланки антиоксидантного захисту з пригніченням інших ланок антиоксидантної системи, на що вказує зниження ЗАА, наприклад, глутатіон-залежних компонентів антиоксидантної системи, а також дефіцитом вітамінів-антиоксидантів, який може спостерігатися внаслідок порушення всмоктування у кишечнику при запаленні. Ці зміни показників антиоксидантної системи в поєднанні з активацією ПОЛ та розвитком карбонільного стресу дозволяють зробити висновок про розвиток оксидативного стресу при хронічному карагенан-індукованому ГЕК, що може обумовлювати індукцію онкопатології при подальшому довготривалому вживанні карагенану.

Висновки.

1. Вживання карагенану протягом 2 тижнів призводить до розвитку дисбалансу між станом прооксидантної та антиоксидантної систем, що свідчить про наявність оксидативного стресу, який прогресує при подальшому вживанні харчової добавки.

2. Значне підвищення концентрації продуктів ОМБ у сироватці крові щурів може бути одним із важливих факторів патогенезу хронічного карагенан-індукованого ГЕК.

3. На ранніх стадіях розвитку хронічного ГЕК антиоксидантний захист обумовлений переважно гіперактивацією СОД та каталази, які попереджують накопичення АФК, а при подальшому прогресуванні захворювання ще більше підвищення їх активності вже недостатньо для компенсації збільшеної генерації АФК.

4. Недостатня реакція системи антиоксидантного захисту на ранній стадії ГЕК та її супресія при 4-тижневому вживанні карагенану скоріш за все обумовлено порушенням всмоктування вітамінів та біогенних елементів з антиоксидантними властивостями.

Перспективи подальших досліджень. Отримані нами дані обґрунтовують перспективу подальших досліджень, спрямованих на вивчення стану білкового та ліпідного спектрів мембран ентероцитів при розвитку хронічного карагенан-індукованого ГЕК.

Література

1. Белоногов Р. Н. Окислительная модификация белков и липидов плазмы крови больных раком легкого / Р. Н. Белоногов, Н. М. Титова, Ю. А. Дыхно [и др.] // Сибирский онкологический журнал. – 2009. – № 4(34) – С. 48-53.
2. Гаврилов Б. В. СФ-метрическое определение содержание ГПЛ в плазме крови / Б. В. Гаврилов, М. И. Мишкорудная // Лаб. дело. – 1983. – № 3. – С. 33-36.
3. Дубинина Е. Е. Окислительная модификация белков плазмы крови больных психиатрическими расстройствами (депрессия, деперсонализация) / Е. Е. Дубинина, М. Г. Морозова, Р. В. Леонова [и др.] // Вопр. мед. химии. – 2000. – Т. 46, № 4. – С. 398-409.
4. Загорский С. Э. Хронические воспалительные заболевания у детей и подростков (современный подход) / С. Э. Загорский, Л. М. Беляева // Минск : БелМАПО. – 2007. – С. 4-28.
5. Клебанов Г. И. Антиоксидантная активность сыворотки крови. / Г. И. Клебанов, И. В. Бабенкова, Ю. О. Теселкин [и др.] // Вест. РАМН. – 1999. – № 2. – С. 15-22.
6. Костюк В. А. Простой и чувствительный метод определения активности СОД, основанный на реакции окисления кверцетина / В. А. Костюк, А. И. Потапович, Ж. В. Ковалева // Вопросы медицинской химии. – 1990. – № 2. – С. 88-91.
7. Патент на винахід № 97322 от 25. 01. 12 «Спосіб моделювання хронічного гастроентероколіту».
8. 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.

9. Федорова Т. К. Реакция с ТБК для определения МДА крови методом флюориметрии / Т. К. Федорова, Т. С. Коршунова, Э. Т. Ларская // Лаб. дело. – 1983. – № 3. – С. 25-28.
10. Bhattacharyya S. Carrageenan-induced NF κ B activation depends on distinct pathways mediated by reactive oxygen species and Hsp27 or by Bcl10 / S. Bhattacharyya, P. K. Dudeja, J. K. Tobacman // Biochim. Biophys. Acta. – 2008. – Vol. 1780 (7-8). – P. 973-82.
11. 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, IARC Press – 2001.
12. Irvine E. J. A critical review of epidemiological studies in inflammatory bowel disease / E. J. Irvine, F. Farrokhyar, E. T. Swarbrick // Scand. J. Gastroenterol. – 2001. – Vol. 36 (1). – P. 2-15.
13. 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.
14. 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.

УДК 577. 12:616. 33/. 34-002. 2:57. 084

СТАН ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ ПРИ ХРОНІЧНОМУ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ ГАСТРОЕНТЕРОКОЛІТІ

Ткаченко А. С., Гопкалов В. Г.

Резюме. В експерименті вивчено показники вільнорадикальних процесів та антиоксидантної системи у сироватці крові щурів з хронічним карагенан-індукованим гастроентероколітом. Встановлено, що дане захворювання супроводжується підвищенням рівня ТБК-активних продуктів, підвищенням вмісту карбонільованих білків, зниженням загальної антиоксидантної активності сироватки крові, підвищенням активностей каталази та супероксиддисмутази, що дозволяє зробити висновок про активацію ліпідної пероксидації, розвиток карбонільного та оксидативного стресів при карагенан-індукованому запаленні кишечника.

Ключові слова: гастроентероколіт, карагенан, ПОЛ, оксидативний стрес, карбонільний стрес, загальна антиоксидантна активність.

УДК 577. 12:616. 33/. 34-002. 2:57. 084

СОСТОЯНИЕ ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ГАСТРОЭНТЕРОКОЛИТЕ

Ткаченко А. С., Гопкалов В. Г.

Резюме. В эксперименте изучены показатели свободнорадикальных процессов и антиоксидантной системы в сыворотке крови крыс с хроническим каррагинан-индуцированным гастроэнтероколитом. Установлено, что данное заболевание сопровождается повышением уровня ТБК-активных продуктов, повышением содержания карбонилированных белков, снижением общей антиоксидантной активности сыворотки крови, повышением активностей каталазы и супероксиддисмутазы, что позволяет сделать вывод об активации липидной пероксидации, развитии карбонильного и оксидативного стрессов при каррагинан-индуцированном воспалении кишечника.

Ключевые слова: гастроэнтероколит, каррагинан, ПОЛ, оксидативный стресс, карбонильный стресс, общая антиоксидантная активность.

UDC 577. 12:616. 33/. 34-002. 2:57. 084

The State of Prooxidant-Antioxidant System in Chronic Experimental Gastroenterocolitis

Tkachenko A. S., Gopkalov V. H.

Abstract. An increase in the number of gastroenterological patients has been found in recent years with the enhanced frequency rate of inflammatory bowel disease cases. It has been established that features of contemporary diet, including excessive consumption of food additives, might be considered as a possible cause of inflammatory bowel disease. 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. It has been known that long-term intake of carrageenan causes the development of chronic gastroenterocolitis (GEC) in rats. This model of chronic carrageenan-induced GEC of moderate severity allows studying the features of carrageenan-induced inflammation of the gastrointestinal tract, such as the status of prooxidant-antioxidant system that is still not investigated.

The aim of the investigation was to study the peculiarities of prooxidant-antioxidant system functioning in rats with chronic carrageenan-induced GEC.

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 GEC 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 concentration of TBA-active products – malonic dialdehyde (MDA) and dienic conjugates (DC), total antioxidant activity (TAA), products of protein oxidative modification (POM), activity of superoxide dismutase (SOD) and catalase in the blood serum were determined by spectrophotometric methods.

It was found that rats the level of TBA-active compounds and concentration of carbonylated proteins in blood serum of rats were significantly increased after 2 weeks of carrageenan intake compared to control group. After one month of carrageenan consumptions their levels were lower compared to the first group, but noticeably higher compared to laboratory animals of the control group. Such changes, indicated the activation of lipid peroxidation and development of carbonyl stress in chronic carrageenan-induced GEC, were more profound after 2 weeks of carrageenan intake.

The level of TAA in blood serum of rats was decreased only after one month of carrageenan intake compared to control group. The activity of both SOD and catalase were increased in animals of the first and the second groups.

The increased activity of SOD and catalase in serum of rats from the first group combined with unchanged serum TAA showed the development of compensatory responses to activation of free radical processes, which, however, were not strongly developed. In experimental animals of the second group a significant suppression of serum antioxidant activity was observed that manifested by slightly increased activity of SOD, catalase and decreased serum TAA. It indicated the development of oxidative stress in animals with chronic carrageenan-induced GEC.

Key words: gastroenterocolitis, carrageenan, lipid peroxidation, oxidative stress, carbonyl stress, total antioxidant activity.

Рецензент – проф. Непорада К. С.

Стаття надійшла 8. 01. 2014 р.