



А. С. Ткаченко<sup>1</sup>, Т. В. Горбач<sup>1</sup>, О. М. Пономаренко<sup>2</sup>

## Особливості білкового спектра і цитокінового складу сироватки крові щурів при хронічному карагенан-індукованому інтестинальному запаленні

<sup>1</sup>Харківський національний медичний університет,

<sup>2</sup>Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна

**Ключові слова:** карагенан, гастроентероколіт, білковий спектр, ФНО- $\alpha$ , інтерлейкіни.

В експерименті на щурах встановили, що хронічний карагенан-індукований гастроентероколіт супроводжується диспротеїнемією з підвищенням  $\alpha_1$ -глобулінів та  $\alpha_2$ -глобулінів на більш ранніх стадіях хронічного запалення та гіпергаммаглобулінемією на пізніших стадіях. Розвиток хронічного карагенан-індукованого гастроентероколіту супроводжується також підвищенням рівнів у сироватці крові щурів як прозапальних цитокінів ФНО- $\alpha$  та ІЛ-1 $\alpha$ , так і протизапального цитокіну ІЛ-4.

### Особенности белкового спектра и цитокинового состава сыворотки крови крыс при хроническом карагенан-индуцированном интестинальном воспалении

А. С. Ткаченко, Т. В. Горбач, А. Н. Пономаренко

В эксперименте на крысах установлено, что хронический карагенан-индуцированный гастроэнтерocolitis сопровождается диспротеинемией с повышением  $\alpha_1$ -глобулинов и  $\alpha_2$ -глобулинов на более ранних стадиях хронического воспаления и гипергаммаглобулинемией на более поздних стадиях. Развитие хронического карагенан-индуцированного гастроэнтерocolitis сопровождается также повышением уровней в сыворотке крови крыс как провоспалительных цитокинов ФНО- $\alpha$  и ИЛ-1 $\alpha$ , так и противовоспалительного цитокина ИЛ-4.

**Ключевые слова:** карагенан, гастроэнтерocolitis, белковый спектр, ФНО- $\alpha$ , интерлейкины.

*Актуальные вопросы фармацевтической и медицинской науки и практики.* – 2014. – № 1 (14). – С. 73–75

### Features of blood serum protein spectrum and cytokine spectrum of rats with chronic carrageenan-induced intestinal inflammation

A. S. Tkachenko, T. V. Gorbach, O. M. Ponomarenko

It was experimentally established that chronic carrageenan-induced gastroenterocolitis was accompanied by dysproteinemia with increased  $\alpha_1$ -globulins and  $\alpha_2$ -globulins in the earlier stages of chronic inflammation and hypergammaglobulinemia in the later stages. The development of chronic carrageenan-induced gastroenterocolitis was also accompanied by elevated levels of both pro-inflammatory cytokines, such as TNF- $\alpha$  and IL-1 $\alpha$ , and anti-inflammatory cytokine IL-4 in blood serum of rats.

**Key words:** carrageenan, gastroenterocolitis, protein spectrum, TNF- $\alpha$ , interleukins.

*Current issues in pharmacy and medicine: science and practice 2014; № 1 (14): 73–75*

В останні роки захворювання кишечника набувають більшої поширеності і вже сьогодні в Україні хвороби шлунково-кишкового тракту (ШКТ) у структурі поширеності всіх захворювань посідають третє місце (9,3%), а в структурі захворюваності – сьоме (4,2%). З кожним роком відзначається чітка тенденція до збільшення цих показників [1].

Особливості сучасного харчування можна вважати можливим джерелом розвитку запальних захворювань кишечника. Інтенсивні зусилля спрямовують нині на вивчення ролі різних специфічних компонентів дієти у розвитку цієї патології [2]. Значну увагу приділяють вивченню значення різних харчових добавок у розвитку запальних захворювань ШКТ, зокрема Е407, що відома як карагенан і використовується у харчовій промисловості як гелеутворювач і загусник. Карагенан – сульфатований полісахарид червоних водоростей, в основі хімічної структури якого знаходиться дисахаридна повторювана ланка, що складається із залишків D-галактози, з'єднаних бета-1,4 й альфа-1,3-глікозидними зв'язками, котрі регулярно чергуються (Rhodophyceae) [3]. Караге-

нан активно використовують в експериментальній медицині для моделювання запальних процесів, у тому числі ШКТ [4]. Незважаючи на розроблену модель хронічного карагенан-індукованого гастроентероколіту (ГЕК) середнього ступеня тяжкості шляхом використання низьких доз карагенану [4] і вивчення особливостей карагенанового запалення в кишечнику [5,6], механізми розвитку цього захворювання залишаються нез'ясованими, зокрема не відомі особливості білкового та цитокінового спектра сироватки крові.

#### Мета роботи

Вивчення особливостей білкового спектра та цитокінового складу сироватки крові щурів з експериментальним хронічним карагенан-індукованим ГЕК.

#### Матеріали і методи дослідження

Експеримент виконали на 30 статевозрілих щурах лінії Вістар, яких утримували у стандартних умовах віварію. Тварин поділили на три групи: перша – 10 лабораторних щурів, які вживали харчову добавку карагенан щодня протягом 2 тижнів; друга – 10 тварин, які вживали карагенан протягом 4 тижнів; третя (конт-

рольна) – 10 інтактних здорових щурів. Моделювання захворювання здійснювали шляхом вільного доступу експериментальних тварин до 1% розчину карагенану в питній воді [4]. Ця модель розроблена на базі відомої моделі карагенан-індукованого виразково-некротичного гастроентероколіту [7]. Розвиток гастроентероколіту через два тижні після початку прийому карагенану підтверджено морфологічно і біохімічно, що засвідчено в патенті [4]. Зокрема, морфологічне дослідження виявило зменшення кількості ворсинок кишечника, їх стоншення, густу лейкоцитарну інфільтрацію власної пластинки слизової оболонки кишечника. Біохімічні дослідження виявили підвищення вмісту гастрину, молекул середньої маси у сироватці крові тварин, а також активацію ліпідної пероксидації, починаючи з кінця другого тижня вживання карагенану.

Утримання тварин і маніпуляції над ними здійснювали відповідно до положень Європейської конвенції «Про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986). Білковий спектр сироватки крові вивчали турбідиметричним методом. Зміни молекулярних мас білків сироватки крові досліджували за допомогою денатуруючого диск-електрофорезу в поліакриламідному гелі [8,9]. Рівні ФНП- $\alpha$ , ІЛ-1 $\alpha$  та ІЛ-4 в сироватці крові експериментальних тварин визначали імуноферментним методом за допомогою набору реактивів фірми «Вектор БЕСТ» (Новосибірськ, Російська Федерація).

Статистичну обробку даних здійснили 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 вірогідним при  $p < 0,05$ .

### Результати та їх обговорення

Протягом аналізу білкового спектра сироватки крові встановили, що достовірної зміни рівня альбумінів у тварин із хронічним карагенан-індукованим гастроентероколітом у порівнянні з контрольною групою не було. Рівень  $\alpha_1$ -глобулінів підвищується через два тижні після початку вживання карагенану і нормалізується через 4 тижні після початку прийому харчової добавки (табл. 1).

Така ж динаміка характерна для змін рівня  $\alpha_2$ -глобулінів. Подібні зміни можуть бути зумовлені підвищенням рівня білків гострої фази, таких як  $\alpha_1$ -кислий глікопротеїн,  $\alpha_1$ -антитрипсин,  $\alpha_2$ -макроглобулін, церулоплазмін, фібриноген, С-реактивний білок, гаптоглобін, підвищення яких зазвичай спостерігають при гострому і на ранніх стадіях хронічного запалення. Це припущення підтверджується аналізом процентного вмісту білків із різними молекулярними масами у сироватці крові.

Встановлено, що двотижневе вживання карагенану супроводжується значним підвищенням високомолекулярних білків ( $>85$  кДа) у сироватці крові, що становили 26,1% від усіх білків сироватки, в контрольній групі цей показник дорівнював лише 14,25% (табл. 2). Така молекулярна маса характерна для більшості білків гострої фази, зокрема для церулоплазміну (132 кДа), С-реактивного білка (105 кДа), гаптоглобіну (86 кДа),  $\alpha_2$ -макроглобуліну (720 кДа), фібриногену (340 кДа). Незначне підвищення рівня  $\beta$ -глобулінів спостерігають при 4-тижневому вживанні карагенану. Також виявили підвищення рівня  $\gamma$ -глобулінів у тварин як першої, так і другої груп, більш виражене при тривалому вживанні харчової добавки карагенан (табл. 1).

Отже, розвиток хронічного карагенан-індукованого ГЕК супроводжується диспротеїнемією. Початкові стадії хронізації запалення – підвищення  $\alpha_1$ -глобулінів і  $\alpha_2$ -глобулінів, на пізніших стадіях хронічного інтестинального карагенан-індукованого гастроентероколіту спостерігають підвищення  $\beta$ -глобулінів і розвиток гіпергамаглобулінемії.

Під час розгляду процентного вмісту білків із різними молекулярними масами в сироватці крові привернула увагу відсутність відмінностей між білковими спектрами тварин контрольної групи і щурами, котрі вживали карагенан протягом 4 тижнів, що свідчить про часткову компенсацію захворювання при тривалішому перебігові захворювання. Незначні зміни виражаються у збільшенні процентного вмісту високомолекулярних білків (молекулярна маса  $>85$  кДа) при 4-тижневому вживанні карагенану, що можна пояснити гіпергамаглобулінемією, оскільки молекулярна маса імуноглобулінів перевищує 150 кДа (табл. 2). Установили також різке зниження вмісту білків із низькою молекулярною масою при 2-тижневому вживанні карагенану (табл. 2). Ці зміни можна вважати відносними й такими, що зумовлені підвищенням високомолекулярної фракції.

Відомо, що маркерами наявності запального процесу є інтерлейкіни. Протягом роботи вивчили вміст ФНП- $\alpha$ , ІЛ-1 $\alpha$  та ІЛ-4 у сироватці крові тварин. Встановлено, що розвиток хронічного карагенан-індукованого ГЕК супроводжується підвищенням у сироватці крові як прозапальних цитокінів ФНП- $\alpha$  і ІЛ-1 $\alpha$ , так і протизапального ІЛ-4. Так, рівень ФНП- $\alpha$  достовірно підвищений у 5,5 раза у порівнянні з аналогічним показником контрольної групи через 2 тижні після початку прийому карагенану піддослідними тваринами. Вживання карагенану протягом 4 тижнів призводить до значного підвищення рівня ФНП- $\alpha$  (більш ніж у 7 разів у порівнянні з контрольними тваринами). Рівень ІЛ-1 $\alpha$  при 2-тижневому вживанні карагенану збільшується у 26,4 раза, а при 4-тижневому – в 64,3 раза у порівнянні з контрольною групою (табл. 3).

Таблиця 1

### Білковий спектр сироватки крові щурів із хронічним карагенан-індукованим гастроентероколітом

Фракція	Альбуміни	$\alpha_1$ -глобуліни	$\alpha_2$ -глобуліни	$\beta$ -глобуліни	$\gamma$ -глобуліни
Контрольна (n=10)	54,45±3,11	4,85±0,33	8,72±0,29	18,34±1,22	10,64±0,93
Гастроентероколіт 2 тижні (n=10)	53,11±2,97	6,11±0,45	10,00±0,55	18,42±1,00	12,36±1,18
Гастроентероколіт 4 тижні (n=10)	52,38±4,12	4,62±0,33	8,90±0,65	20,41±1,34	13,69±1,11

**Таблиця 2**  
**Процентний вміст білків із різними молекулярними масами у сироватці крові щурів із хронічним карагенан-індукованим гастроентероколітом**

Молекулярна маса (Да)	Контрольна (n=10)	Гастро-ентероколіт 2 тижні (n=10)	Гастро-ентероколіт 4 тижні (n=10)
Більше ніж 85 000	14,25%	26,1%	15,93%
65 000–85 000	7,06%	9,73%	5,74%
40 000–65 000	13,44%	7,6%	13,06%
25 000–40 000	9%	10,1%	8,9%
Менш ніж 25 000	56,25%	46,47%	56,37%

**Таблиця 3**  
**Показники рівня цитокінів у сироватці крові експериментальних тварин**

Група тварин	ФНП-α (пг/мл)	ІЛ-1α (пг/мл)	ІЛ-4 (пг/мл)
Контрольна	4,135±0,7041	19,06±1,244	0,4914±0,1272
Гастроентероколіт 2 тижні	23,55±3,661 p<0,001	503,4±149,9 p<0,01	7,505±0,6878 p<0,0001
Гастроентероколіт 4 тижні	29,47±5,235 p<0,001	1225,0±209,8 p<0,001	23,67±1,334 p<0,0001

Відомо, що прозапальні цитокіни ФНП-α і ІЛ-1α, котрі діють синергічно, індуюють гострофазову відповідь, у тому числі при захворюваннях ШКТ [10]. Отже, підвищення α<sub>1</sub>-глобулінів і α<sub>2</sub>-глобулінів на більш ранніх стадіях хронічного ГЕК можна пояснити стимулюючим впливом ФНП-α і ІЛ-1α на секрецію білків гострої фази гепатоцитами.

Рівень ІЛ-4 при 2-тижневому прийомі карагенану збільшений у 15,3 раза, а при 4-тижневому – в 48,2 раза у порівнянні з аналогічним показником контрольної групи (табл. 3). Відомо, що ІЛ-4 – протизапальний цитокін, котрий включений у регуляцію проникності епітелію кишечника; його рівень підвищується при хронічних запальних захворюваннях кишечника, зокрема при хворобі Крона [11].

Отже, виявлене протягом експерименту підвищення рівня ІЛ-4 може зумовити підвищення проникності епітелію кишечника, що викликає подальше прогресування запального процесу. Проникність епітелію кишечника, що модулюється ІЛ-4, при хронічному карагенан-індукованому ГЕК підвищується, а це відповідно викликає підвищення проникності слизової оболонки кишечника для люмінальних антигенів і транслокацію бактерій-коменсалів із подальшим включенням їх у патологічний процес. Це пояснює визначені зміни білкового спектра у щурів, зокрема гіпергамаглобулінемію, що характерна для експериментальних тварин першої і другої груп і найбільш виражена через 4 тижні після вживання харчової добавки карагенану.

#### Висновки

1. Хронічний карагенан-індукований ГЕК супроводжується розвитком диспротеїнемії з підвищенням α<sub>1</sub>-глобулінів та α<sub>2</sub>-глобулінів на більш ранніх стадіях

хронічного запалення та гіпергамаглобулінемією на пізніших стадіях.

2. У сироватці крові щурів із хронічним карагенан-індукованим ГЕК підвищується вміст ФНП-α, ІЛ-1α та ІЛ-4, рівень яких збільшується під час подальшого прогресування захворювання.

3. Значне збільшення вмісту ІЛ-4 у крові тварин із хронічним карагенан-індукованим ГЕК може зумовити підвищення проникності слизової оболонки кишечника для люмінальних антигенів і транслокацію бактерій-коменсалів із подальшим їх залученням у патологічний процес.

Наведені результати отримали протягом виконання НДР «Вивчення віддалених наслідків регулярного споживання харчових продуктів, що містять генетично модифіковані організми, в умовах пошкодження епітеліального бар'єра шлунково-кишкового тракту» (номер державної реєстрації 0110 U000653).

**Перспективними є подальші дослідження**, що спрямовані на вивчення впливу харчової добавки карагенану на ШКТ експериментальних тварин для запобігання його негативного впливу на здоров'я людей.

#### Список літератури

1. Ткач С.М. Настоящее и будущее гастроэнтерологии / С.М. Ткач // Здоров'я України. – 2008. – № 7. – С. 33–34.
2. Соколова Е.В. Изучение in vitro и ex vivo антиоксидантной активности каррагинанов – сульфатированных полисахаридов красных водорослей / Е.В. Соколова, А.О. Барabanова, В.А. Хоменко // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2010. – Т. 150. – № 10. – С. 398–401.
3. 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.
4. Патент на винахід «Спосіб моделювання хронічного гастроентероколіту» від 25.01.12 р. № 97322.
5. Ткаченко А.С. Уровень VEGF и ФНО-α при хроническом каррагенан-индуцированном гастроэнтерocolите / А.С. Ткаченко // Вісник проблем біології і медицини. – 2013. – Т. 2(103). – Вип. 3. – С. 231–234.
6. Posokhov Ye.O. Influence of carrageenan (E 407) on the membrane of enterocytes investigated by fluorescent probes / Ye. Posokhov, A.S. Tkachenko, Ye.M. Korniyenko // Вісник проблем біології і медицини. – 2013. – Вип. 1. – Т. 1(98). – С. 229–233.
7. 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.
8. Westermeyer R. Electrophoresis in Practice / R. Westermeyer // Weinheim-New York: WILEY-VCH. – 2001. – P. 350.
9. Галь Э. Электрофорез в разделении биологических макромолекул / Э. Гааль, Г. Медьеша, Л. Верецкеи. – М., 1982. – С. 448.
10. Niederau C. Inflammatory mediators and acute phase proteins in patients with Crohn's disease and ulcerative colitis / C. Niederau, F. Backmerhoff, B. Schumacher [et al.] // Hepatogastroenterology. – 1997. – №. 94(13). – С. 90–107.
11. Di Leo V. Factors regulating the effect of IL-4 on intestinal epithelial barrier function. / V. Di Leo, P.C. Yang, M.C. Berin [et al.] // Int. Arch. Allergy Immunol. – 2002. – № 129(3). – P. 219–227.

#### Відомості про авторів:

Ткаченко А.С., очний аспірант каф. біологічної хімії, Харківський національний медичний університет,

E-mail: antontkachenko@mail.ru.

Горбач Т.В., к. біол. н., доцент каф. біологічної хімії, Харківський національний медичний університет.

Пономаренко О.М., викладач каф. біохімії біологічного факультету, Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна.

Надійшла в редакцію 03.02.2014 р.