

УДК 616.33/341-002-092.9:546.172.2

*А.С. Ткаченко, В.Г. Гопкалов, М.А. Орлова***СИСТЕМА ГЕНЕРАЦИИ ОКСИДА АЗОТА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ГАСТРОЭНТЕРОКОЛИТЕ**

Харьковский национальный медицинский университет, г. Харьков

**Резюме.** Изучена активность эндотелиальной и индуцибельной NO-синтазы, а также содержание S-нитрозотиолов в гомогенате тонкой кишки крыс при хроническом экспериментальном гастроэнтероколите, вызванном употреблением пищевой добавки каррагинан в течение двух и четырех недель. Установлено, что двухнедельный прием каррагинана приводит к снижению активности eNOS и повышению активности iNOS в гомогенате тонкой кишки, что обуславливает увели-

чение продукции монооксида азота (NO) и, соответственно, S-нитрозотиолов. Обнаруженное снижение образования NO при четырехнедельном употреблении каррагинана указывает на потенциальную роль недостаточности NO в развитии нарушений микроциркуляции и хронизации воспаления.

**Ключевые слова:** гастроэнтероколит, каррагинан, крысы, оксид азота, S-нитрозотиолы.

**Введение.** Характерной особенностью современного питания является употребление продуктов, содержащих всевозможные пищевые добавки. Одна из таких добавок – каррагинан (E407) – используется в мясной, молочной и кондитерской промышленности в качестве загустителя и гелеобразователя. Каррагинан представляет собой сульфатированный полисахарид красных морских водорослей, в основе химической структуры которого находится дисахаридное повторяющееся звено, состоящее из остатков D-галактозы, соединенных регулярно чередующимися  $\beta$ -1,4 и  $\alpha$ -1,3-гликозидными связями [2]. Структурное разнообразие каррагинанов обусловлено присутствием  $\beta$ -1,4 остатка в виде 3,6-ангидрогалактозы, а также количеством и местоположением сульфатных групп в моносахаридных остатках [6]. В то же время, многочисленные эксперименты на животных демонстрируют вклад каррагинана в индукцию и прогрессирование кишечных новообразований, развитие воспалительных процессов и язв в слизистой оболочке желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) [12]. Однако каррагинан по-прежнему остается широко используемой пищевой добавкой.

Несмотря на разработанную модель хронического каррагинанового гастроэнтероколита (ГЭК) средней степени тяжести, без язвенно-некротического процесса, путем использования низких доз каррагинана [4] и изучение некоторых особенностей каррагинан-индуцированного воспаления в кишечнике [1, 5], механизмы развития данного заболевания остаются невыясненными. В частности, не изучено состояние системы генерации NO в тонкой кишке на разных этапах хронического каррагинан-индуцированного воспаления ЖКТ.

**Цель исследования.** Изучить активность индуцибельной NO-синтазы (iNOS), эндотелиальной NO-синтазы (eNOS), а также содержание S-нитрозотиолов в гомогенате тонкой кишки при хроническом каррагинан-индуцированном ГЭК.

**Материал и методы.** Эксперимент проводили на половозрелых крысах-самках линии Ви-

стар, которые содержались в стандартных условиях вивария. Животные были разделены на три группы. Первая группа состояла из животных, которые принимали пищевую добавку каррагинан в течение двух недель, а животные второй группы – в течение четырех недель. Употребление каррагинана приводит к развитию хронического ГЭК, наличие которого было подтверждено биохимическими и морфологическими методами [4]. Контрольная группа состояла из интактных животных. Моделирование заболевания осуществлялось путем свободного доступа экспериментальных животных к 1 % раствору каррагинана в питьевой воде [4]. Содержание животных и манипуляции над ними проводили в соответствии с положениями Европейской конвенции «О защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986). Лабораторных животных выводили из эксперимента путем декапитации под тиопенталовым наркозом. Немедленно после декапитации кишечник извлекали на холоде и перфузировали охлажденным физиологическим раствором. Ткань замораживали, измельчали до порошкообразного состояния. Готовили гомогенат в 0,25 М трис HCl, содержащий 0,32 М сахарозы (в соотношении 1:9). Гомогенат центрифугировали 15 минут при 3000 об./мин. (1200 g), супернатант использовали для исследования. Для оценки содержания S-нитрозотиолов в гомогенате тонкой кишки использовали спектрофлуориметрический метод [8]. NO-синтазную активность в гомогенате тонкой кишки определяли спектрофотометрическим методом по приросту содержания нитрита в реакционной смеси, содержащей 50 мМ дигидрофосфата калия (pH 7), 1 мМ хлорида магния, 1 мМ НАДФН и 2 мМ хлорида кальция (для измерения активности eNOS или 4мМ ЭДТА (для связывания эндогенного кальция при измерении активности iNOS), в течение 15 минут при 37°C [3]. Статистическую обработку данных проводили с помощью пакетов программы GraphPad Prism 5. Для выявления различий между независимыми группами норма-

льно распределенных величин использовали t-критерий Стьюдента-Фишера; различия между группами считали статистически достоверными при  $p < 0,05$ .

#### Результаты исследования и их обсуждение.

При проведении эксперимента измерялась активность eNOS, iNOS и уровень S-нитрозотиолов в гомогенате тонкой кишки экспериментальных животных.

Выявлено достоверное снижение активности eNOS в гомогенате тонкой кишки крыс на 17,7 % через две недели употребления, и на 25 % – через четыре недели приема каррагинана (табл.), что может быть обусловлено выявленным ранее снижением эндотелина-1 при каррагинан-индуцированном ГЭК [1], который стимулирует продукцию eNOS. Выявленное уменьшение активности eNOS приводит к снижению конститутивной продукции оксида азота, что может быть важным фактором дальнейшего прогрессирования воспалительного процесса ЖКТ, поскольку eNOS-продуцируемый NO вовлечен в регуляцию целого ряда процессов в кишечнике, включая поддержание адекватной перфузии кишечника, регуляцию микрососудистой и эпителиальной проницаемости [7]. Таким образом, обнаруженное снижение активности eNOS вносит вклад в повышение проницаемости эпителиального барьера тонкой кишки с последующим возможным вовлечением в патологический процесс люминальной микрофлоры. Известно, что eNOS-продуцируемый NO оказывает противовоспалительное действие, которое обусловлено ингибирующим влиянием оксида азота на хемотаксис и адгезию лейкоцитов [9]. Следовательно, снижение активности eNOS при хроническом каррагинан-индуцированном ГЭК вносит вклад в вовлечение в патологический процесс все новых и новых иммунокомпетентных клеток, стимулируя тем самым хронизацию воспаления.

В результате проведенного исследования установлено, что активность iNOS в гомогенате тонкой кишки животных первой группы на

77,6 % выше по сравнению с аналогичным показателем контрольной группы (табл.). Известно, что провоспалительные цитокины, в том числе и ФНО- $\alpha$ , индуцируют экспрессию гена iNOS. Повышение активности iNOS может быть обусловлено не непосредственной экспрессией iNOS поврежденными энтероцитами, а вовлеченными в воспалительный процесс клетками, в первую очередь макрофагами, с помощью продукции провоспалительных цитокинов, например, ФНО- $\alpha$ , уровень которого увеличивается при каррагинан-индуцированном ГЭК [5]. Однако дальнейшее развитие хронического ГЭК сопровождается снижением активности iNOS, которая составляет лишь 63,6 % от активности iNOS в гомогенате кишечника крыс контрольной группы (табл.). Выявленное снижение активности iNOS может быть объяснено снижением активности поли(АДФ-рибоза)-полимеразы (ПАРП), которое наблюдается при хроническом каррагинановом ГЭК [1].

При отсутствии ПАРП повреждена NF- $\kappa$ B-зависимая транскрипция генов, кодирующих провоспалительные медиаторы, в том числе нарушена и экспрессия iNOS [10]. NF- $\kappa$ B представляет собой белок, который конститутивно присутствует в клетках, однако в цитоплазме он связан с белками-ингибиторами, известными как I $\kappa$ B. Эти белки-ингибиторы подлежат немедленной деградации под действием ФНО- $\alpha$ , что приводит к освобождению NF- $\kappa$ B и последующей экспрессии провоспалительных генов, включая ген iNOS [10]. Однако, для экспрессии некоторых провоспалительных генов, но не всех, необходима ассоциация NF- $\kappa$ B с ПАРП [10]. К таким генам относится и ген iNOS. Поскольку при развитии хронического каррагинанового ГЭК наблюдается снижение активности ПАРП [1], снижена и NF- $\kappa$ B-зависимая экспрессия iNOS. Этот механизм может обусловить выявленное нами снижение активности iNOS в гомогенате крыс при 4-недельном употреблении каррагинана на фоне повышения провоспалительного цитокина ФНО- $\alpha$  [5]. Такое снижение активности iNOS,

Таблица

#### Показатели активности ферментов синтеза монооксида азота и содержание S-нитрозотиолов в гомогенате тонкой кишки крыс с хроническим каррагинан-индуцированным гастроэнтероколитом (M $\pm$ m)

Показатели	Животные контрольной группы	Животные, употреблявшие каррагинан в течение 2 недель	Животные, употреблявшие каррагинан в течение 4 недель
	n=10	n=10	n=10
Индукцибельная NO-синтаза, нмоль/г белка	0,165 $\pm$ 0,003	0,293 $\pm$ 0,014 p<0,001	0,105 $\pm$ 0,001 p<0,001
Эндотелиальная NO-синтаза, нмоль/г белка	0,74 $\pm$ 0,01	0,61 $\pm$ 0,003 p<0,001	0,56 $\pm$ 0,007 p<0,001
S – нитрозотиолы, мкмоль/л	0,48 $\pm$ 0,02	0,57 $\pm$ 0,03 p<0,001	0,28 $\pm$ 0,02 p<0,001

которая является одним из самых мощных генераторов свободных радикалов, может свидетельствовать об адаптации крыс и о развитии частичного компенсаторного ответа. Снижение активности iNOS у животных второй группы обуславливает и менее выраженную активность свободнорадикальных процессов при прогрессировании хронического каррагинан-индуцированного интестинального воспаления.

Изменения активности iNOS на разных этапах хронического ГЭК однонаправлены с изменениями концентрации стабильных метаболитов оксида азота – S-нитрозотиолов. В ходе проведенного исследования выявлено незначительное статистически достоверное повышение уровня S-нитрозотиолов на 19 % у животных первой группы, при сравнении с крысами контрольной группы (табл.). При дальнейшем употреблении каррагинана уровень S-нитрозотиолов снижается – у крыс второй группы уровень S-нитрозотиолов снижен на 42 % по сравнению с контрольной группой (табл.). Прежде всего, циркулирующий пул NO образует S-нитрозотиолы, которые рассматривают как буферную систему, играющую важную роль в хранении и транспортировке оксида азота. Особенно важно то, что S-нитрозотиолы способны выделять NO в местах их физиологической необходимости. Поэтому S-нитрозотиолы рассматриваются как основное депо NO в организме. Повышение концентраций S-нитрозотиолов в гомогенате тонкой кишки свидетельствует о наличии метаболитов NO, имеющих потенциальную биологическую активность и, таким образом, позволяет предположить отсутствие количественного дефицита NO у крыс первой группы. Источником оксида азота для образования S-нитрозотиолов является оксид азота iNOS-зависимого происхождения. Незначительное повышение уровня S-нитрозотиолов на фоне более выраженного повышения активности iNOS отражает достаточный уровень биодоступности и повышенное потребление NO тканями, что может иметь как положительный эффект (обусловленный регуляторным действием NO), так и негативный эффект (благодаря генерации пероксинитрита). Снижение концентрации S-нитрозотиолов в гомогенате кишечника животных второй группы отражает снижение продукции оксида азота как iNOS, так и eNOS. Такие изменения уровня S-нитрозотиолов и активности NO-синтаз свидетельствуют о дефиците оксида азота при 4-недельном употреблении каррагинана.

#### Выводы

1. Хронический гастроэнтероколит, развившийся при 2-недельном употреблении каррагинана, сопровождается снижением активности эндотелиальной NO-синтазы и повышением активности индуцибельной NO-синтазы в гомогенате тонкой кишки, что приводит к увеличению продукции монооксида азота и, соответственно, S-нитрозотиолов, что свидетельствует о достаточном уровне обеспечения тканей оксидом азота.

2. Сниженный синтез монооксида азота при более поздних стадиях хронического каррагинан-индуцированного гастроэнтероколита указывает на потенциальную роль недостаточности монооксида азота в развитии нарушений микроциркуляции и хронизации воспаления.

3. Как при 2-недельном, так и при 4-недельном употреблении каррагинана основным источником S-нитрозотиолов является монооксид азота, продуцируемый индуцибельной NO-синтазой, обладающий прооксидантными свойствами и способный активировать синтез провоспалительных цитокинов.

#### Литература

1. Жуков В.И. Система перекисного окисления липидов и активность апоптоза при экспериментальном хроническом гастроэнтероколите / В.И. Жуков, А.С. Ткаченко // Научные ведомости БелГУ. Серия Медицина. Фармация. – № 18 (161), Вып. 23. – С. 134-137.
2. Изучение *in vitro* и *ex vivo* антиоксидантной активности каррагинанов – сульфатированных полисахаридов красных водорослей / Е.В. Соколова, А.О. Барабанова, В.А. Хоменко [и др.] // Бюл. Эксперим. биол. и мед. – 2010. – Т. 150, № 10. – С. 398-401.
3. Особенности образования оксида азота до и после операции на врожденных пороках сердца с легочной гипертензией / М.Ф. Зинковский, Н.М. Гулая, Г.В. Косяков [и др.] // Серце і судини. – 2005. – № 1. – С. 47-52.
4. Пат. 97322 Україна, МПК G09B 23/28. Спосіб моделювання хронічного гастроентероколіту / Іваненко Т.О., Коробчанський В.О., Губіна-Вакулик Г.І., Горбач Т.В., Колоусова Н.Г.; Заявник Харківський національний медичний університет. – № заяв. а201014510 від 06.12.2010; опубл. 25.01.2012, Бюл. № 2.
5. Ткаченко А.С. Уровень VEGF и ФНО- $\alpha$  при хроническом каррагинан-индуцированном гастроэнтероколите / А.С. Ткаченко // Вісн. пробл. біол. і мед. – 2013. – Т. 2 (103), Вип. 3. – С. 231-234.
6. Aguilan J.T. Structural Analysis of Carrageenan from Farmed Varieties of Philippine Seaweed / J.T. Aguilan, J.E. Broom, J.A. Hemmingson // Bot. Mar.– 2003. – Vol. 46 (2). – P. 179-192.
7. Alican I. A critical role for nitric oxide in intestinal barrier function and dysfunction / I. Alican, P. Kubers // Am. J. Physiol. – 1996. – № 33. – P. 225-237.
8. Marzining M. Improved methods end products of nitric oxide in biological fluids: nitrites, nitrates and S-nitrosothiols / M. Marzining, A.K. Nussler, J. Stadler // Nitric oxide. – 1997. – Vol. 1. – P. 177-189.
9. Reactive nitrogen and oxygen species attenuate interleukin-8-induced neutrophil chemotactic activity *in vitro* / E. Sato, K.L. Simpson, M.B. Grisham [et al.] // J. Biol. Chem. – 2000. – № 275. – P. 10826-10830.
10. Resistance to endotoxic shock as a consequence of defective NF- $\kappa$ B activation in poly (ADP-ribose) polymerase-1 deficient mice / F.J. Oliver, J. Menisier-de Murcia, J. Nacci [et al.] // EMBO J. – 1999. – № 18. – P. 4446-4454.
11. Ruetten H. Endothelin-1 stimulates the biosynthesis of tumour necrosis factor in macrophages: ET-receptors, signal transduction and inhibition by dexamethasone / H. Ruetten, C. Thiemeermann // J. Physiol. Pharmacol. – 1997. – № 48. – P. 675-688.
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.

**СИСТЕМА ГЕНЕРАЦІЇ ОКСИДУ АЗОТУ ТОНКОЇ КИШКИ ПРИ  
ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ ГАСТРОЕНТЕРОКОЛІТІ***А.С. Ткаченко, В.Г. Гопкалов, М.О. Орлова*

**Резюме.** Вивчено активність ендотеліальної та індукцибельної NO-синтаз, а також вміст S-нітрозотіолів у гомогенаті тонкої кишки щурів при хронічному експериментальному гастроентероколіті, який був викликаний вживанням карагенану протягом двох і чотирьох тижнів. Встановлено, що двотижнєве вживання карагенану призводить до зниження активності eNOS та підвищення активності iNOS у гомогенаті тонкої кишки, що зумовлює збільшення продукції NO і, відповідно, S-нітрозотіолів. Виявлений знижений синтез NO при чотиритижневому вживанні карагенану вказує на потенційну роль недостатності NO в розвитку порушень мікроциркуляції і хронізації запалення.

**Ключові слова:** гастроентероколіт, карагенан, щури, оксид азоту, S-нітрозотіоли.

**THE SYSTEM OF NITROGEN OXIDE GENERATION OF SMALL INTESTINE  
IN EXPERIMENTAL GASTROENTEROCOLITIS***A.S. Tkachenko, V.H. Hopkalov, M.A. Orlova*

**Abstract.** The activity of endothelial and inducible NO-synthases and the content of S-nitrosothiols were studied in the small intestine homogenates of rats with chronic experimental gastroenterocolitis caused by food additive carrageenan intake during 2 and 4 weeks. It was established that carrageenan intake during 2 weeks led to a decrease of eNOS activity and increased the activity of iNOS in small intestine homogenate, causing increased production of NO and, therefore of S-nitrosothiols. A decreased NO synthesis in four-week use of carrageenan indicated a potential role of NO deficiency in the development of microcirculatory disorders and chronic inflammation.

**Key words:** gastroenterocolitis, carrageenan, rats, nitric oxide, S-nitrosothiols.

National Medical University (Kharkiv)

Рецензент – проф. Ю.Є. Роговий

Buk. Med. Herald. – 2014. – Vol. 18, № 2 (70). – P. 109-112

Надійшла до редакції 12.02.2014 року