

УДК 616.33/34-002.2-091.8-092.9(043.3)

А.С. Ткаченко

**FASL-ІНДУКОВАНИЙ АПОПТОЗ ПРИ ХРОНІЧНОМУ
КАРАГЕНАНОВОМУ ГАСТРОЕНТЕРОКОЛІТІ**

Харківський національний медичний університет

Резюме. Вивчено вміст sFasL та активність каспази-3 у сироватці крові щурів при експериментальному хронічному гастроентероколіті, який розвився при вживанні карагенану протягом двох та чотирьох тижнів. Встановлено, що дане захворювання супроводжується підвищенням активності каспази-3, більш вираженому при тривалішому вживанні карагенану, що дозволяє зробити висновок про активацію апоптозу при карагенановому запаленні шлунково-кишкового тракту. Також спостерігається підвищення рівня sFasL, більш

виражене при вживанні карагенану протягом двох тижнів. Це свідчить про переважання FasL-опосередкованого апоптозу ентероцитів на ранніх стадіях та значнішу роль інших механізмів апоптозу на більш пізніх стадіях хронічного карагенан-індукованого інтестинального запалення.

Ключові слова: гастроентероколіт, карагенан, щури, sFasL, каспаза-3.

Вступ. В останні роки захворювання шлунково-кишкового тракту (ШКТ) набувають більшої поширеності. За прогнозами експертів ВООЗ, у XXI столітті патологія системи травлення нарівні із серцево-судинною патологією у структурі захворюваності населення посідатиме одне з провідних місць. Вже сьогодні в Україні захворювання ШКТ у структурі поширеності серед усіх захворювань посідають третє місце [3]. Одним із можливих етіологічних факторів захворювань ШКТ, зокрема хронічних запальних захворювань кишечника (хвороби Крона та виразкового коліту), може слугувати довготривале вживання харчової добавки карагенан (E407), яка використовується у харчовій промисловості як загусник, гелутворювач та для покращення текстури продуктів [6]. Відомо, що щоденне вживання карагенану щурами протягом двох тижнів призводить до розвитку хронічного карагенан-індукованого гастроентероколіту (ГЕК) [1], модель якого може використовуватися для вивчення особливостей запалення кишечника. Зокрема відомо, що розвиток хронічного карагенан-індукованого ГЕК супроводжується активацією апоптозу ентероцитів [2], однак особливості механізмів розвитку апоптозу ентероцитів при карагенановому інтестинальному запаленні вивчено недостатньо.

Мета дослідження. Вивчити особливості FasL-індукованого апоптозу ентероцитів у щурів з експериментальним хронічним карагенан-індукованим ГЕК.

Матеріал і методи. Експеримент проводили на 30 статевозрілих щурах лінії Вістар, які містилися в стандартних умовах віварію. Тварин розподілили на три групи. Перша група включала в себе 10 лабораторних тварин, які вживали харчову добавку карагенан щодня протягом двох тижнів. Друга група складалася з 10 щурів, які вживали карагенан протягом чотирьох тижнів. Третя група була контрольною та складалася з 10 інтактних здорових тварин. Моделювання захворювання здійснювалося шляхом вільного доступу експериментальних тварин до 1 % розчину карагенану в питній воді [1]. Розвиток гастроентеро-

коліту через два тижні після початку прийому карагенану підтверджено морфологічно і біохімічно [1]. 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). Рівні розчинного Fas-ліганду (sFasL) та каспази-3 у сироватці крові експериментальних тварин визначали імуноферментним методом за допомогою наборів реактивів фірми «eBioScience» (Відень, Австрія). Розраховувалися середня арифметична величина – M , похибка середньої арифметичної – m . Для виявлення розбіжностей між незалежними групами нормально розподілених величин використовували t -критерій Стьюдента-Фішера; відмінності між групами вважали статистично достовірними при $p < 0,05$. Для оцінки ступеня кореляційної залежності використовували розрахований за допомогою програми GraphPad Prism 5 коефіцієнт кореляції Спірмена – r .

Результати дослідження та їх обговорення.

У ході проведеного дослідження встановлено, що в сироватці крові експериментальних тварин, що вживали харчову добавку карагенан, достовірно підвищується рівень sFasL. Так, у тварин 1-ї групи спостерігається статистично значиме підвищення рівня sFasL у 9,8 раза порівняно зі щурами контрольної групи (табл.). При подальшому вживанні карагенану вміст sFasL значно знижується, однак, достовірно перевищує показники контрольної групи в 1,6 раза (табл.). Виявлене в ході дослідження підвищення рівня sFasL може бути зумовлене розвитком оксидативного стресу, який розвивається при карагенан-індукованому ГЕК [4], оскільки відомо, що активні форми кисню є медіаторами, які індукують експресію FasL [4], що дозволяє припустити залучення оксидативного стресу у FasL-опосередкований апоптоз при даному захворюванні.

Виявлені зміни рівня sFasL дозволяють припустити залученість FasL-опосередкованого апоптозу ентероцитів у патогенез хронічного

Таблиця

Вміст sFasL та каспази-3 у сироватці крові тварин (M±m)

Показники	Тварини контрольної групи	Тварини, що вживали карагенан протягом 2 тижнів	Тварини, що вживали карагенан протягом 4 тижнів
	n=10	n=10	n=10
sFasL, нг/мл	0,19±0,05	1,87±0,80*	0,31±0,02*
Каспаза-3, нг/мл	0,90±0,10	7,52±0,49**	34,57±1,64**

Примітка. 1. n – кількість тварин у групі; 2. * – достовірність відмінностей порівняно з показниками щурів групи контролю; 3. Одна позначка – $p < 0,05$, дві позначки – $p < 0,0001$

карагенан-індукованого ГЕК. При цьому, внесок FasL-індукованого апоптозу ентероцитів більш виражений у тварин на ранніх стадіях хронічного карагенан-індукованого запалення.

Відомо, що взаємодія sFasL з Fas-рецептором призводить до кластеризації рецепторних доменів, з подальшою активацією FAS-асоційованого домену смерті (FADD), який у свою чергу активує прокаспазу-8, що безпосередньо (шляхом часткового протеолізу) або опосередковано (через вивільнення мітохондріями цитохрому C з подальшим формуванням фактору, що активує апоптотичні пептидази – APAF-1 та активацією прокаспазу-9) викликає утворення активної ефекторної каспази-3 з прокаспазу-3 [5]. Каспаза-3 являє собою основну ефекторну каспазу, що розщеплює клітинні субстрати, і активація якої є ключовою фазою апоптозу. При аналізі рівня каспази-3 у сироватці крові експериментальних тварин виявлено достовірне підвищення рівня ферменту при розвитку карагенанового ГЕК. Активність каспази-3 підвищена у 8,3 раза у тварин 1-ї групи, а у тварин 2-ї групи, що вживали карагенан протягом чотирьох тижнів, спостерігається ще більш виражена активація каспази-3, рівень якої в сироватці крові у 38,4 раза перевищує концентрацію цього ферменту в щурів контрольної групи (табл.). Тобто, активність каспази-3 збільшується при подальшому прогресуванні захворювання, що свідчить про більш виражений апоптоз ентероцитів при тривалішому вживанні карагенану.

Проведений кореляційний аналіз встановив наявність сильного позитивного кореляційного зв'язку між активністю каспази-3 та рівнем sFasL у сироватці крові у тварин 1-ї групи ($r=+0,84$), що підтверджує значну роль FasL-опосередкованого апоптозу на ранніх стадіях хронічного карагенан-індукованого ГЕК. При подальшому розвитку захворювання спостерігається зниження ступеня кореляції між активністю каспази-3 та рівнем sFasL ($r=+0,41$), що свідчить про зниження ролі FasL-опосередкованого апоптозу ентероцитів на більш пізній стадії хронічного запалення. Водночас у тварин 2-ї групи спостерігається більш виражене підвищення активності каспази-3 у сироватці крові, що свідчить про збільшення вираженості апоптотичних процесів у кишечнику, що при зниженні ролі FasL-індукованого апоптозу

ентероцитів може свідчити про значнішу роль інших механізмів апоптозу на більш пізніх стадіях хронічного карагенан-індукованого інтестинального запалення.

Висновки

1. Хронічний гастроентероколіт, що викликаний вживанням харчової добавки карагенан протягом двох тижнів, супроводжується підвищенням активності каспази-3 та рівня sFasL у сироватці крові щурів, що свідчить про активацію апоптозу ентероцитів при хронічному карагенан-індукованому гастроентероколіті.

2. Наявність сильного позитивного кореляційного зв'язку ($r=+0,84$) між активністю каспази-3 та рівнем sFasL у сироватці крові при двотижневому вживанні харчової добавки свідчить про значну роль FasL-опосередкованого апоптозу на даній стадії захворювання.

3. При вживанні карагенану протягом чотирьох тижнів активність каспази-3 надалі збільшується при зниженні рівня sFasL у сироватці крові, що вказує на зниження ролі FasL-опосередкованого апоптозу ентероцитів із можливим залученням у патологічний процес інших механізмів запрограмованої смерті клітин кишечника.

Література

1. Пат. на винахід 97322 Україна, МПК G09B 23/28 (2006.01) Спосіб моделювання хронічного гастроентероколіту / Іваненко Т.О., Коробчинський В.О., Губіна-Вакулик Г.І., Горбач Т.В., Колосова Н.Г.: заявник і патентовласник Харківський нац. мед. ун-т. – №201014510; заявл. 06.12.2010; опубл. 25.10.2012, Бюл. №2/2012.
2. Жуков В.И. Система перекисного окислення липидов и активность апоптоза при экспериментальном хроническом гастроэнтероколите / В.И. Жуков, А.С. Ткаченко // Науч. вед. Бел. ун-та. Медицина. Фармация. – № 18 (161), Вып. 23. – С. 138-141.
3. Ткач С.М. Настоящее и будущее гастроэнтерологии / С.М. Ткач // Здоров'я України. – 2008. – С. 33-34.
4. Oxidative stress induces the expression of Fas and Fas ligand and apoptosis in murine intestinal epithelial cells / T.L. Denning, H. Takaishi, S.E. Crowe [et al.] // Free Radic. Biol. Med. – 2002. – Vol. 33, № 12. – P. 1641-1650.
5. FAS and Fas ligand in gut and liver / M.J. Pinkoski, T. Brunner, D. R. Green [et al.] // Am. J. Physiol. – 2000. – Vol. 278. – P. 354-366.
6. 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.

**FASL-ИНДУЦИРОВАННЫЙ АПОПТОЗ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ КАРРАГИНАНОВОМ
ГАСТРОЭНТЕРОКОЛИТЕ***А.С. Ткаченко*

Резюме. Изучено содержание sFasL и активность каспазы-3 в сыворотке крови крыс при экспериментальном хроническом гастроэнтероколите, который развился при употреблении каррагинана в течение двух и четырёх недель. Установлено, что данное заболевание сопровождается повышением активности каспазы-3, более выраженном при длительном употреблении каррагинана, что позволяет сделать вывод об активации апоптоза при каррагинановом воспалении желудочно-кишечного тракта. Также наблюдается повышение уровня sFasL, более выраженное при употреблении каррагинана в течение двух недель. Это свидетельствует о преобладании FasL-опосредованного апоптоза энтероцитов на ранних стадиях и значительную роль других механизмов апоптоза на более поздних стадиях хронического каррагинан-индуцированного интестинального воспаления.

Ключевые слова: гастроэнтероколит, каррагинан, крысы, sFasL, каспаза-3.

**FASL-MEDIATED APOPTOSIS IN CHRONIC CARRAGEENAN-INDUCED
GASTROENTEROCOLITIS***A.S. Tkachenko*

Abstract. The levels of sFasL and caspase-3 activity were studied in blood serum of rats with chronic gastroenterocolitis developed after intake of carrageenan during 2 and 4 weeks. It was established that the disease was accompanied by increased activity of caspase-3, more considerable in case of more prolonged carrageenan consumption suggesting activation of apoptosis in chronic intestinal carrageenan-induced inflammation. The elevated level of sFASL was observed, which was higher after 2 weeks of carrageenan intake. It indicated the predominance of FasL-mediated apoptosis of enterocytes in the early stages and the significant role of other mechanisms of apoptosis in the later stages of chronic carrageenan-induced intestinal inflammation.

Key words: enterocolitis, carrageenan, rats, sFasL, caspase-3.

National Medical University (Kharkiv)

Рецензент – проф. Ю.Є. Роговий

Buk. Med. Herald. – 2014. – Vol. 18, № 1 (69). – P. 117-119

Надійшла до редакції 26.12.2013 року