



## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МЕДИЦИНА

УДК 616.33/.34-002.2-018.2:582.2731-074

### УРОВЕНЬ ФАКТОРА НЕКРОЗА ОПУХОЛЕЙ АЛЬФА И АКТИВНОСТЬ МАТРИКСНОЙ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ-2 ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ КАРРАГЕНАН-ИНДУЦИРОВАННОМ ГАСТРОЭНТЕРОКОЛИТЕ

**В.И. ЖУКОВ**  
**А.С. ТКАЧЕНКО**

*Харьковский национальный  
медицинский университет*

*e-mail: antontkachenko@mail.ru*

В эксперименте на крысах изучено содержание уровня ФНО- $\alpha$ , активность матриксной маталлопротеиназы-2 (ММР-2) в сыворотке крови крыс с хроническим каррагенан-индуцированным гастроэнтероколитом. Установлено, что данное заболевание сопровождается повышением уровня ФНО- $\alpha$  и активацией ММР-2. Обнаружена однонаправленность повышения уровня ФНО- $\alpha$  и активности ММР-2 на ранних стадиях хронизации воспаления.

Ключевые слова: гастроэнтероколит, каррагенан, ФНО- $\alpha$ , ММР-2.

Введение. В последние годы воспалительные заболевания кишечника привлекают внимание к себе внимание в силу нарастающей распространенности, сохраняющейся высокой частоты хирургических вмешательств, и, следовательно, серьезной медико-социальной значимости. По прогнозам экспертов ВОЗ в XXI веке патология системы пищеварения, наравне с сердечно-сосудистой патологией, в структуре заболеваемости населения будет занимать одно из ведущих мест. Уже сегодня в Украине заболевания желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) по распространенности среди всех заболеваний занимают 3-е место (9,3%), а в структуре заболеваемости – 7-е (4,2%). С каждым годом отмечается четкая тенденция к увеличению этих показателей [1]. При этом в структуре заболеваемости населения за последние годы намечается увеличение случаев возникновения хронических воспалительных заболеваний кишечника [2-4]. Стало ясно, что характерные особенности диеты могут рассматриваться в качестве возможного источника развития воспалительных заболеваний кишечника. В связи с этим в настоящее время интенсивные усилия направлены на изучение вклада различных специфических компонентов питания [5, 6]. Особое внимание уделяется изучению роли различных пищевых добавок в развитие воспалительных заболеваний ЖКТ, которые могут провоцировать развитие патологических состояний. В обширном ряду всевозможных пищевых добавок, наше внимание привлекла пищевая добавка Е407, известная как каррагенан. Влияние каррагенана как на организм человека в целом, так и на состояние ЖКТ в частности изучается уже на протяжении последних 50 лет. Каррагенаны представляют собой сульфатированные полисахариды красных водорослей, в основе химической структуры которых находится дисахаридное повторяющееся звено, состоящее из остатков D-галактозы, соединенных регулярно чередующимися бета-1,4- и альфа-1,3-гликозидными связями (Rhodophyceae) [7]. В патологической физиологии каррагенан используют для моделирования перитонита, плеврита, артрита и каррагенан-индуцированного отека лап у крыс, при этом введение происходит путем инъекции [8, 9] Известна также модель язвенно-некротического каррагенан-индуцированного гастроэнтероколита (ГЭК), который развивается при добавлении 2% раствора лямбда-каррагенана в питьевую воду [10]. В Харьковском национальном медицинском университете на базе модели язвенно-некротического каррагенан-индуцированного гастроэнтероколита разработана модель хронического каррагенанового гастроэнтероколита средней степени тяжести, без язвенно-некротического процесса, путем использования более низких доз каррагенана (Патент на изобретение № 97322 от 25.01.12 «Спосіб моделювання хронічного гастроентероколіту»), что позволяет изу-



чать особенности каррагенанового воспаления в кишечнике. Механизмы развития данного заболевания изучены недостаточно.

Некоторые авторы считают, что фактор некроза опухолей альфа (ФНО-α) является центральным фактором, повреждающим эпителий кишечника при воспалительных процессах. В частности, важность ФНО-α очевидна в инициации воспаления при болезни Крона и язвенном колите. [11, 12]. Поэтому интерес представляет изучение содержания ФНО-α при каррагенан-индуцированном ГЭКе и его возможная роль в патогенезе данного заболевания. Также наше внимание было сфокусировано на особенности ответа внеклеточного матрикса на хроническое каррагенановое воспаление и возможную роль матриксной металлопротеиназы-2 (ММП-2) в ремоделировании внеклеточного матрикса, так как влияние каррагенана на активность металлопротеиназ и связь между уровнем ФНО-α и активностью ММП-2 изучены недостаточно.

**Целью** работы явилось изучение уровня ФНО-α и активности ММП-2 в сыворотке крови крыс с экспериментальным хроническим гастроэнтероколитом.

**Материалы и методы.** 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 каррагенана в питьевой воде. Установлено с помощью биохимических и морфологических методов исследования (Патент на изобретение № 97322 от 25.01.12 «Спосіб моделювання хронічного гастроентероколіту»), что развитие ГЭКа 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). Уровень ФНО-α определяли иммуноферментным методом с помощью набора реактивов фирмы «Вектор БЕСТ» (Новосибирск, Российская Федерация). Активность ММП-2 определяли иммуноферментным методом с помощью набора реактивов фирмы «Quantikine» (Миннеаполис, США). 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  $p < 0,05$ .

**Результаты и их обсуждение.** При развитии хронического каррагенан-индуцированного воспаления кишечника уровень ФНО-α в крови экспериментальных животных повышается в 5,7 раз через две недели после начала приема данной пищевой добавки, а через 4 недели – в 7,1 раза по сравнению с аналогичным показателем у крыс группы контроля (табл. 1). Следовательно, прогрессирование заболевания, сопровождается медленным нарастанием уровня ФНО-α, играющего важную роль в хронизации каррагенанового воспаления. Механизмы ФНО-зависимой инициации и амплификации воспаления в кишечнике являются комплексными и до сих пор изучены недостаточно. В частности, доминирующая роль ФНО-α может быть обусловлена развитием нерегулируемой реакции на люминальные антигены и бактерии-комменсалы [13], что приводит к развитию разрушительного воспалительного ответа в слизистой оболочке кишечника. ФНО-индуцированная потеря энтероцитов может приводить к повышенной проницаемости эпителия и ускоренного тока люминальных антигенов. Вдобавок к этим прямым эффектам на целостность эпителиального барьера, ФНО-α действует косвенно, индуцируя процессы, активирующие воспалительные процессы в собственной пластинке кишечника. Каррагенин-индуцированное хроническое воспаление кишечника может быть обусловлено повышением проницаемости слизистой оболочки для люминальных антигенов, которые не могут элиминироваться клетками иммунной системы с достаточной эффективностью [13].

Таблица 1

**Показатели уровня ФНО-α в сыворотке крови экспериментальных животных**

Группы животных	ФНО-α (пг/мл)
Контрольная (n=10)	4,135±0,7041
Гастроэнтероколит 2 недели (n=10)	23,55±3,661 p<0,001
Гастроэнтероколит 4 недели (n=10)	29,47±5,235 p<0,001

Эффекты ФНО-α при каррагенановом воспалении могут быть также опосредованы активацией матричных металлопротеиназ. ФНО-α является мощным индуктором матричных металлопротеиназ в



стромальных клетках собственной пластинке кишечника, что было показано на культуре фетальных клеток кишечника Lionetti с соавторами [14]. MMP-2, также известная как желатиназа А или коллагеназа IV типа, является наиболее экспрессируемой матричной металлопротеиназой, встречающаяся практически во всех тканях и клетках, хотя MMP-2 все-таки более известна как фермент принимающий участие в деградации внеклеточного матрикса.

Таблица 2

### Показатели функции эндотелия кишечника экспериментальных животных

Группы животных	MMP-2 (нг/мл)
Контрольная (n=10)	7,287±0,2101
Гастроэнтероколит 2 недели (n=10)	22,81±1,212 p<0,0001
Гастроэнтероколит 4 недели (n=10)	11,43±0,3252 p<0,0001

При хроническом каррагенан-индуцированном ГЭЖе наблюдается повышение активности MMP-2 в сыворотке крови через 2 недели после начала приема пищевой добавки в три раза. Дальнейшее прогрессирование заболевания сопровождается снижением активности MMP-2, однако активность фермента все равно в 1,5 раза повышена по сравнению с контрольной группой (табл. 2).

MMP-2 разрушает коллаген IV типа, являющийся основным компонентом базальных мембран [15]. Обнаруженное нами истончение базальной мембраны и исчезновение ее в некоторых участках при морфологическом исследовании препаратов тонкого кишечника может быть обусловлено активацией MMP-2. MMP-2 экспрессируется в основном в мезенхимальных клетках (преимущественно фибробласты) во время развития тканевой регенерации. ФНО- $\alpha$  стимулирует секрецию MMP-2, что позволяет предположить важную роль данного цитокина в ремоделировании внеклеточного матрикса при хронических воспалительных процессах [16]. ФНО- $\alpha$  активирует экспрессию ядерного фактора транскрипции NF- $\kappa$ B фактор. Активация NF- $\kappa$ B необходима для индукции экспрессии MT1-MMP (матриксная металлопротеиназа мембранного типа) в фибробластах, которая в свою очередь принимает участие в активации про-MMP-2 [16]. ФНО-индуцируемая продукция MMP-2 приводит, таким образом, к ускорению деградации и ремоделированию внеклеточного матрикса.

#### Выводы:

1. Увеличение уровня ФНО- $\alpha$  при развитии хронического каррагенан-индуцированного гастроэнтероколита свидетельствует о его значительной роли в механизмах патогенетического процесса.
2. Механизм ФНО-зависимой инициации и амплификации воспаления в кишечнике является комплексным, в частности установленное нами повышение активности MMP-2, имеющим односторонний характер с изменениями уровня ФНО- $\alpha$  на ранней стадии хронизации интестинального воспаления, свидетельствует о влиянии ФНО- $\alpha$  на ответ внеклеточного матрикса при хроническом воспалении.
3. Увеличение активности MMP-2 на начальных стадиях каррагенан-индуцированного гастроэнтероколита и снижение в более поздние сроки свидетельствует об участии данного фермента в ремоделировании внеклеточного матрикса.

#### Литература

1. Ткач, С.М. Настоящее и будущее гастроэнтерологии / С.М. Ткач // Здоров'я України. – 2008. – С. 33-34.
2. Загорский, С.Э. Хронические воспалительные заболевания у детей и подростков (современный подход) / С.Э. Загорский, Л.М. Беляева // Минск: БелМАПО. – 2007. – С. 4-28.
3. Ekblom A. The epidemiology of IBD / A. Ekblom // Inflamm. Bowel. Dis. – 2004. – Vol. 10 (Suppl. 1). – P. 32-43.
4. Насыхова, Ю.А. Молекулярно-генетические аспекты развития воспалительных заболеваний кишечника: болезни Крона и язвенного колита / Ю.А. Насыхова // Автореф. дис. канд. мед. наук Ю.А. Насыхова – Санкт-Петербург – 2012. – 18 с.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. Nicklin S. Effect of orally administered foodgrade carrageenans on antibody-mediated and cellmediated immunity in the inbred rat / Nicklin S., Miller K. // Food. Chem. Toxicol. – 1984. – Vol. 22. – P. 615-621.



9. Di Rosa M. Review: Biological properties of carrageenan / Di Rosa M. // *J. Pharm. Pharmacol.* – 1972. – Vol. 24. – P. 89-102.
10. 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.
11. Neurath M.F. Predominant pathogenic role of tumor necrosis factor in experimental colitis in mice / Neurath M.F., Fuss I., Pasparakis M., Alexopoulou L. [et al.] // *Eur. J. Immunol.* – 1997. – Vol. 27. – P. 1743-1750.
12. Ricart E. Infliximab for Crohn's disease in clinical practice at the Mayo Clinic: the first 100 patients / Ricart E., Panaccione R., Loftus E.V. [et al.] // *Am. J. Gastroenterol.* – 2001. – Vol. 96. – P. 722-728.
13. Corazza N.S. Nonlymphocyte-derived tumor necrosis factor is required for induction of colitis in recombination activating gene (RAG)2<sup>-/-</sup> mice upon transfer of CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>hi</sup> T cells / Corazza N.S., Eichenberger, H.P. Eugster, C. Mueller // *J. Exp. Med.* – 1999. – Vol. 190. – P. 1479-1492.
14. Lionetti P. T-cell activation can induce either mucosal destruction or adaptation in cultured human fetal small intestine / Lionetti P, Breese E, Braegger C.P. [et al.] // *Gastroenterology.* – 1993. – Vol. 105. – P. 373-381.
15. C. B. Basbaum. Focalized proteolysis: spatial and temporal regulation of extracellular matrix degradation at the cell surface / C. B. Basbaum, Z. Werb // *Cell Biol.* – 1996. – Vol. 8. – P. 731.
16. Han Y.P. TNF-alpha stimulates activation of pro-MMP2 in human skin through NF-(kappa)B mediated induction of MT1-MMP / Han Y.P., Tuan T.L., Wu H. [et al.] // *J. Cell Sci.* – 2001. – Vol. 114. – P. 131-139.

## **LEVEL OF TNF- $\alpha$ AND ACTIVITY OF MMP-2 IN CHRONIC CARRAGEENAN-INDUCED GASTROENTEROCOLITIS**

**V. ZHUKOV**  
**A. TKACHENKO**

*Kharkiv National  
Medical University*

*e-mail: antontkachenko@mail.ru*

The level of TNF- $\alpha$  and activity of MMP-2 were investigated in blood serum of rats with chronic carrageenan-induced gastroenterocolitis. It was found that this disease was accompanied by increased level of TNF- $\alpha$  and activation of MMP-2. Unidirectional increase of TNF- $\alpha$  concentration and MMP-2 activity was observed in the earlier stages of chronic inflammation.

Keywords: gastroenterocolitis, carrageenan, TNF- $\alpha$ , MMP-2.