

УДК 616.12+616.341+616.36]-008.87-092.9
DOI 10.11603/bmbr.2706-6290.2019.2.10690

Н. В. Ліснянська

ВДНЗ «Буковинський державний медичний університет МОЗ України»

ОСОБЛИВОСТІ СИСТЕМИ АНТИОКСИДАНТНОГО ЗАХИСТУ ЩУРІВ ЗА УМОВИ ДІЇ КАРАГІНАНУ НА ТЛІ СТРЕПТОЗОТОЦИНОВОГО ДІАБЕТУ

Особливості системи антиоксидантного захисту щурів за умови дії карагінану на тлі стрептозотоцинового діабету

Н. В. Ліснянська

ВДНЗ «Буковинський державний медичний університет МОЗ України»

Резюме. Незважаючи на велику кількість наукових доведень щодо підтримки безпеки карагінану, на даний час практично відсутня інформація про його дію в умовах патологічного стану організму.

Мета дослідження – визначити активність показників системи антиоксидантного захисту при застосуванні 1,0 % розчину κ-карагінану в щурів зі стрептозотоциніндукованим діабетом (СТД).

Матеріали і методи. Дослідження проведено на 120 білих нелінійних самцях-щурах з дотриманням принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986). Цукровий діабет моделювали шляхом одноразового внутрішньочеревного введення тваринам стрептозотоцину («Sigma Aldrich», США, в дозі 60 мг/кг маси тіла). Хронічний ентероколіт (ХЕК) відтворювали шляхом вільного доступу тварин до 1,0 % розчину карагінану в питній воді протягом 1 місяця.

Результати. Встановлено зниження активності ензимної ланки системи антиоксидантного захисту, зокрема активність СОД у гемолізаті еритроцитів зменшилася на 37,8 % і каталази в плазмі крові – на 48,5 % у тварин із СТД. Експериментальний ХЕК супроводжувався зростанням активності ферментної ланки системи антиоксидантного захисту (СОД на – 44,8 % і каталази – на 25,6 %, $p < 0,01$) стосовно контрольної групи. У щурів із хронічним ентероколітом на тлі стрептозотоцинового діабету виявлено зниження активності ензимної ланки системи антиоксидантного захисту, зокрема активність СОД у гемолізаті еритроцитів зменшилася на 59,5 % і каталази в плазмі крові – на 62,7 %.

Висновки. За умови хронічного ентероколіту на тлі стрептозотоциніндукованого діабету активуються оксидативні процеси за рахунок зниження супероксиддисмутазної і каталазної активності у крові дослідних тварин.

Ключові слова: стрептозотоциновий діабет; хронічний ентероколіт; супероксиддисмутаза, каталаза.

Peculiarities of the anti-oxidant defense system of rats during carrageenan influence in streptozotocin diabetes

N. V. Lisnianska

Bukovinian State Medical University

e-mail: lisnianska.nata@bsmu.edu.ua

Summary. Despite the large amount of scientific evidence to support the safety of carrageenan, there is currently little information on the effect of carrageenan in conditions of the pathological state of the body.

The aim of the study – to determine the activity of the antioxidant protection system when using 1.0 % solution of κ-carrageenan in rats with streptozotocin-induced diabetes (SID).

Materials and Methods. The study was conducted on 120 white non-linear male rats complied with the principles of the European Convention for the Protection of Laboratory Animals. Diabetes mellitus was modeled by single intraperitoneal administration of streptozotocin to animals (Sigma Aldrich, USA, at a dose of 60 mg/kg body weight). Chronic enterocolitis (CEC) was reproduced by free animal access to 1.0 % solution of carrageenan in drinking water for 1 month.

Results. It was found reduced enzyme activity of the antioxidant protection system, in particular, SOD activity in erythrocyte hemolysate decreased by 37.8 % and catalase in blood plasma by 48.5% in animals with SID. Experimental CEC was accompanied by an increase in the activity of the enzyme link of the antioxidant protection system (SOD by 44.8 % and catalase by 25.6 %, $p < 0.01$) vs. control. In rats with chronic enterocolitis on the background of streptozotocin diabetes decreased activity of the enzyme link of the antioxidant system, in particular, the activity of SOD in hemolysate of erythrocytes decreased by 59.5 % and catalase in blood plasma – by 62.7 %.

Conclusions. In case of chronic enterocolitis on the background of streptozotocin-induced diabetes, oxidative processes are activated by reducing the superoxide dismutase and catalase activity in the rats' blood.

Key words: streptozotocin diabetes; chronic enterocolitis; superoxide dismutase, catalase.

ВСТУП

Серед харчових добавок полісахариди добре відомі як функціональні добавки, що мають високу молекулярну масу, добре розчиняються у воді й використовуються для покращення текстури кінцевої продукції [1, 2]. В останні десятиріччя карагіани стали одними з найпопулярніших гідроколоїдів у харчовій промисловості [3]. Варто відмітити, що на даний час вони мають найвищий комерційний загальний обсяг виробництва (близько 60 тис. тонн на рік), що становить 626 млн доларів США щорічного прибутку [4]. Основним їх призначенням є утворення гелів, тому карагіани широко використовують як емульгатори, стабілізатори, загусники [5]. Враховуючи те, що вони належать до розчинних харчових волокон і беруть участь у регулюванні гомеостазу, мають імуностимулювальну й антикоагулянтну властивості, що робить цікавим їх застосування у харчових продуктах функціонального призначення [6].

Разом з тим, безпечна добова доза споживання харчових добавок неоднозначна. Незважаючи на те, що безпека карагану в харчових продуктах обговорюється протягом десятиріч, E407 зберігає статус безпечної добавки «Generally Regarded as Safe». Експертний комітет із харчових добавок FAO/WHO встановив його допустиму добову дозу – до 75 мг на 1 кг маси тіла [7]. У 2015 р. Спільний експертний комітет з харчових добавок WHO дійшов висновку про безпеку застосування карагану в дитячих сумішах [8]. Його також використовують у фармацевтичній, косметичній, поліграфічній і текстильній промисловостях [9, 10].

Проте існують суперечливі дані щодо безпеки карагану. В ряді досліджень зазначено, що він активує сигнальні запальні шляхи, що приводить до індукції прозапальних цитокінів [11, 12]. Результати інших досліджень показують, що карагані проходять через кишковий епітелій; переносяться через порталний кровообіг до печінки; зв'язуються з TLR4 й індукують прозапальні реакції, а також пригнічують чутливість до інсуліну [13]. Незважаючи на велику кількість наукових доказів на підтримку безпеки карагану, на даний час практично відсутня інформація щодо його дії в умовах патологічного стану організму. Це створює передумови для глибшого вивчення в умовах експерименту біохімічних процесів, що відбуваються у стінці кишки та інших органах при застосуванні карагану за умови цукрового діабету.

Метою дослідження було визначити активність показників системи антиоксидантного захисту при застосуванні 1,0 % розчину к-карагану в щурів зі стрептозотоциніндукованим діабетом.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Дослідження проведено на 106 білих нелінійних самцях-щурах, яких утримували на стандартному раціоні віварію Тернопільського державного медичного університету імені І. Я. Горбачевського МОЗ України. Під час роботи дотримувалися принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986). Дослідних щурів поділили на чотири групи: перша – контрольна (інтактні тварини), друга – тварини з цукровим діабетом, третя – щури з хронічним ентероколітом, четверта – тварини з цукровим діабетом і хронічним ентероколітом. Цукровий діабет (СТД) моделювали шляхом одноразового внутрішньочеревного введення 2-місячним тваринам стрептозотоцину (Sigma Aldrich, США, в дозі 60 мг/кг маси тіла) [14]. Безпосередньо перед введенням стрептозотоцину розчиняли в 0,1 молярному цитратному буфера (рН 4,5); контрольній групі вводили відповідну кількість цитратного буфера. В експерименті використовували тварин із рівнем глюкози не нижче 10,8 ммоль/л через 2 тижні після введення стрептозотоцину. Хронічний ентероколіт було відтворено шляхом вільного доступу тварин до 1,0 % розчину карагану в питній воді протягом 1 місяця [15,16]. Евтаназію тварин проводили шляхом пункції серця під глибокою анестезією відповідно до вимог Комітету з догляду за тваринами [17].

Одночасно з процесами ПОЛ реєстрували активність ферментів антиоксидантного захисту: каталази [18], супероксиддисмутази [19].

Отримані дані піддавали статистичній обробці. Для перевірки на відповідність вибірок даних нормального закону розподілу було застосовано розрахунок критерію Шапіро–Уїлка. У зв'язку з відсутністю відповідно до даних нормального розподілу на рівні значимості $p < 0,05$ обчислювали середньовибіркові характеристики: медіану (Me), першу і третю квартилі (Q25–Q75). Рівень статистичної значущості відмінностей вибірок оцінювали за допомогою непараметричного критерію Манна–Уїтні. Відмінності вважали статистично значущими при досягнутому рівні $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Інгібування процесів вільнорадикального окиснення залежить від активності системи антиоксидантного захисту, перш за все від СОД, яка забезпечує ферментну дисмутацію супероксидного радикала, що є попередником активних форм оксигену. Разом з тим, інший ензим – каталаза, дезактивує пероксиду гідроген, що утворюється в результаті реакції СОД і супероксидний радикал. Встановлено зниження активності ензимної ланки системи антиоксидантного захисту, зокрема активність СОД у гемолізаті еритроцитів зменшилася на

37,8 % і каталази в плазмі крові – на 48,5 % у тварин із STD (табл.). Експериментальний ХЕК супроводжувався зростанням активності ферментної ланки системи антиоксидантного захисту (СОД на 44,8 % і каталази на 25,6 %, $p < 0,01$) стосовно контрольної групи (табл.). У щурів із хронічним ентероколітом на тлі стрептозотоцинового діабету виявлено зниження активності ензимної ланки системи антиоксидантного захисту, зокрема активність СОД в гемолізаті еритроцитів зменшилася на 59,5 % і каталази в плазмі крові – на 62,7 %. Отримані дані свідчать про порушення рівноваги між системами про-антиоксиданти, що вказує на поглиблення оксидативного стресу клітин у разі розвитку хронічного ентероколіту на тлі стрептозотоцинового діабету.

Зменшення активності СОД може бути пов'язано з ушкоджувальним впливом вільних радикалів на металопротеїновий комплекс ензиму, що містить мідь, цинк або марганець. Низька активність каталази може бути пов'язана з підвищенням концентрації водневих іонів, які приводять до появи протонної форми ферменту, що володіє зміненою каталітичною активністю [20, 21]. Необхідно зазначити, що у четвертій дослідній групі були найвищі показники ПОЛ і найнижчі дані системи антиоксидантного захисту стосовно інших дослідних груп. Отже, активація вільнорадикальних реакцій є важливим неспецифічним механізмом розвитку запалення тканин тонкої і товстої кишок на тлі цукрового діабету.

Таблиця. Показники ензимної ланки системи антиоксидантного захисту в крові щурів із хронічним ентероколітом на тлі стрептозотоцинового діабету, Ме (Q25–Q75)

Показник	Контрольна група	STD, друга група	ХЕК, третья група	STD+ХЕК четверта група
Активність СОД, нг/мл/Нв	3,12 (2,78;3,48)	2,04* (1,78;2,15)	4,60* (4,18;4,83)	1,25* (1,12;1,38) $p_{1,2} < 0,001$
Активність каталази, мкмоль/с·л	4,03 (3,87;4,14)	2,09* (1,84;2,27)	5,10* (4,91;5,21)	1,52* (1,31;1,65) $p_{1,2} < 0,001$

Примітки: 1) * – відмінність між контрольною і дослідною групами статистично значима ($p < 0,05$ – $0,001$);

2) p_1 – показник достовірності між другою і четвертою групами;

3) p_2 – показник достовірності між третьою і четвертою групами.

ВИСНОВКИ

За умови хронічного ентероколіту на тлі стрептозотоцину індукованого діабету активуються окси-

датовні процеси за рахунок зниження супероксид-дисмутазної і каталазної активності у крові дослідних тварин.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Costa M. Use of edible films and coatings in cheese preservation: Opportunities and challenges / M. Costa // *Food Research International*. – 2018. – Vol. 107. – P. 84–92.

2. González R. E. Effect of *Lactobacillus acidophilus* addition on mechanical and barrier properties of binary films during storage / R. E. González, T. R. Ortega, L. A. García // *Contemporary Engineering Sciences*. – 2018. – Vol. 11. – P. 269–282.

3. Mahmood W. A. K. Effects of reaction temperature on the synthesis and thermal properties of carrageenan ester / W. A. K. Mahmood, M. M. R. Khan, T. C. Yee // *Journal of Physical Science*. – 2014. – Vol. 25, No. 1. – P. 123–138.

4. Rhein-Knudsen N. Seaweed hydrocolloid production: an update on enzyme assisted extraction and modification technologies / N. Rhein-Knudsen, M. T. Ale, A. S. Meyer // *Mar. Drugs*. – 2015. – Vol. 13. – P. 3340–3359.

5. Кучерук З. І. Використання полісахаридів рослинного і мікробного походження в технології безбілкового хліба : монографія / З. І. Кучерук, О. С. Цуканова. – Х : ХДУХТ, 2014. – 131 с.

6. Weiner M. L. Food additive carrageenan: Part II: A critical review of carrageenan in vivo safety studies /

M. L. Weiner // *Crit. Rev. Toxicol.* – 2014. – Vol. 44, No. 3. – P. 244–269.

7. Younes M. Re-evaluation of carrageenan (E 407) and processed *Eucheuma* seaweed (E 407a) as food additives / M. Younes // *EFSA Journal*. – 2018. – Vol. 16, No. 4. – P. 5238.

8. McKim J. M. Jr. Effects of carrageenan on cell permeability, cytotoxicity, and cytokine gene expression in human intestinal and hepatic cell lines. Author links open overlay panel / J. M. Jr. McKim // *Food and Chemical Toxicology*. – 2016. – Vol. 96. – P. 1–10.

9. Carrageenan and its applications in drug delivery / L. Li, R. Ni, Y. Shao, S. Mao // *Carbohydr. Polym.* – 2014. – Vol. 103. – P. 1–11.

10. Araujo J. V. Novel porous scaffolds of pH responsive chitosan/carrageenan-based polyelectrolyte complexes for tissue engineering / J. V. Araujo // *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*. – 2014. – Vol. 102, No. 12. – P. 4415–4426.

11. Shang Q. Carrageenan-induced colitis is associated with decreased population of anti-inflammatory bacterium, *Akkermansia muciniphila*, in the gut microbiota of

C57BL/6J mice / Q. Shang // *Toxicology Letters*. – 2017. – Vol. 279. – P. 87–95.

12. Bhattacharyya S. Carrageenan-induced colonic inflammation is reduced in Bcl10 null mice and increased in IL-10 deficient mice / S. Bhattacharyya // *Mediat. Inflamm.* – 2013. – Vol. 2013. – P. 397642.

13. Exposure to common food additive carrageenan alone leads to fasting hyperglycemia and in combination with high fat diet exacerbates glucose intolerance and hyperlipidemia without effect on weight / S. Bhattacharyya, L. Feferman, T. Unterman, J. K. Tobacman // *J. Diabetes Res.* – 2015. – Vol. 2015. – Article ID 513429. 13 p.

14. Mic A. A. Indomethacin inhibits thymic involution in mice with streptozotocin-induced diabetes / A. A. Mic, F. A. Mic, C. A. Tatu // *Comparative Medicine*. – 2007. – Vol. 57, No 5. – P. 476–481.

15. Moyana T. N. Carrageenan-induced intestinal injury in the rat—a model for inflammatory bowel disease / T. N. Moyana, J. M. Lalonde // *Annals of Clinical & Laboratory Science*. – 1990. – Vol. 20, No. 6. – P. 420–426.

16. Пат. 97322. Україна, МПК: G09B 23/28. Спосіб моделювання хронічного гастроентероколіту / Г. І. Губіна-Вакулик, Н. Г. Колоусова, Т. О. Іваненко,

Т. В. Горбач, В. О. Коробчанський ; власник Харківський Нац. Мед. ун-т. – № а201014510 ; заявл. 06.12.2010 ; опублік. 25.01.2012, Бюл. № 2. – 4 с.

17. Резніков О. Загальні етичні принципи експериментів на тваринах / О. Резніков // *Endokrynolohiya*. – 2003. – Vol. 8 (1). – P. 142–145.

18. Королюк М. А. Метод определения активности каталазы / М. А. Королюк, Л. И. Иванова, И. Г. Майорова // *Лаб. дело*. – 1988. – № 1. – С. 16–18.

19. Макаренко Е. В. Комплексное определение активности супероксиддисмутазы и глутатионредуктазы в эритроцитах у больных с хроническими заболеваниями печени / Е. В. Макаренко // *Лаб. дело*. – 1988. – № 11. – С. 48–50.

20. Марущак М. І. Особливості енергозабезпечення стінки тонкої кишки при хронічному ентероколіті на фоні стрептозототциніндукованого діабету в щурів / М. І. Марущак, Н. В. Ліснянська, Г. Г. Габор // *Вісник наукових досліджень*. – 2017. – № 3. – С. 133–136.

21. Chronic enterocolitis combined with streptozotocin-induced diabetes in rats: mechanism of oxidative stress development / N. V. Lisnianska, M. I. Marushchak, I. V. Antonyshyn, O. P. Mialiuk // *International Journal of Medicine and Medical Research*. – 2017. – Vol. 3 (2). – P. 59-63.

REFERENCES

1. Costa M. Use of edible films and coatings in cheese preservation: Opportunities and challenges. *Food Research International*. 2018;107: 84-92.

2. González RE, Ortega TR, García LA. Effect of *Lactobacillus acidophilus* addition on mechanical and barrier properties of binary films during storage. *Contemporary Engineering Sciences*. 2018;11: 269-82.

3. Mahmood WAK., Khan MMR, Yee TC. Effects of reaction temperature on the synthesis and thermal properties of carrageenan ester. *Journal of Physical Science*. 2014;25(1): 123-38.

4. Rhein-Knudsen N, Ale MT, Meyer AS. Seaweed hydrocolloid production: an update on enzyme assisted extraction and modification technologies. *Mar. Drugs*. 2015;13: 3340-59.

5. Kucheruk ZI, Tsukanova OS. Use of plant and microbial polysaccharides in protein-free bread technology: monograph. [Використання полісахаридів рослинного і мікробного походження в технології безбілкового хліба : монографія] Kharkiv: KhDHDT; 2014. Ukrainian.

6. Weiner ML. Food additive carrageenan: Part II: A critical review of carrageenan in vivo safety studies. *Crit Rev Toxicol*. 2014;44(3): 244-69.

7. Younes M. Re-evaluation of carrageenan (E 407) and processed *Eucaema* seaweed (E 407a) as food additives. *EFSA Journal*. 2018;16(4): 5238.

8. McKim JMJr. Effects of carrageenan on cell permeability, cytotoxicity, and cytokine gene expression in human intestinal and hepatic cell lines. Author links open overlay panel. *Food and Chemical Toxicology*. 2016;96: 1-10.

9. Li L, Ni R, Shao Y, Mao S. Carrageenan and its applications in drug delivery. *Carbohydr Polym*. 2014;103: 1-11.

10. Araujo JV. Novel porous scaffolds of pH responsive chitosan/carrageenan-based polyelectrolyte complexes

for tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research*. Part A. 2014;102(12): 4415-26.

11. Shang Q. Carrageenan-induced colitis is associated with decreased population of anti-inflammatory bacterium, *Akkermansia muciniphila*, in the gut microbiota of C57BL/6J mice. *Toxicology Letters*. 2017;279: 87-95.

12. Bhattacharyya S. Carrageenan-induced colonic inflammation is reduced in Bcl10 null mice and increased in IL-10 deficient mice. *Mediat Inflamm* 2013; 2013: 397642.

13. Bhattacharyya S, Feferman L, Unterman T, Tobacman JK. Exposure to common food additive carrageenan alone leads to fasting hyperglycemia and in combination with high fat diet exacerbates glucose intolerance and hyperlipidemia without effect on weight. *J Diabetes Res*. 2015;2015: 513429.

14. Mic AA, Mic FA, Tatu CA. Indomethacin inhibits thymic involution in mice with streptozotocin-induced diabetes. *Comparative Medicine*. 2007;57(5): 476-81.

15. Moyana TN, Lalonde JM. Carrageenan-induced intestinal injury in the rat—a model for inflammatory bowel disease. *Annals of Clinical & Laboratory Science*. 1990;1;20(6): 420-6.

16. Gubina-Vakulik GI, Kolousova NG, Ivanenko TO, Gorbach TV, Korobchansky Method for modeling chronic gastroenterocolitis. VA Patent 97322. Ukraine. 2012;2: a201014510.

17. Reznikov OG. General ethical principles of animal experiments. *Endokrynolohiia*. 2003;8(1): 142-5. Ukrainian.

18. Korolyuk MA, Ivanova LI, Mayorova IG. [Method for determination of catalase activity]. *Lab. delo*. 1988;1: 16-8. Russian.

19. Makarenko EV. Comprehensive determination of the activity of superoxide dismutase and glutathione reductase in red blood cells in patients with chronic liver diseases. *Lab delo*. 1988;11: 48-50. Russian.

20. Marushchak MI, Lisnianska NV, Habor HH. Features of energy supply to the small intestine wall in chronic enterocolitis on the background of streptozotocin-induced diabetes in rats. *Visn nauk doslidz.* 2017;3: 133-6. Ukrainian.

21. Lisnianska NV, Marushchak MI, Antonyshyn IV, Mialiuk OP. Chronic enterocolitis combined with streptozotocin-induced diabetes in rats: mechanism of oxidative stress development. *International Journal of Medicine and Medical Research.* 2017;3(2): 59-63.

Отримано 12.11.19