

DOI: 10.26693/jmbs02.03.032

УДК 577.114.4:616.34-002-092.9:665.939.35

Ткаченко А. С., Губина-Вакулик Г. И., Горбач Т. В.,  
Денисенко С. А., Онищенко А. И.

## ПЕРОРАЛЬНОЕ УПОТРЕБЛЕНИЕ ПИЩЕВОЙ ДОБАВКИ КАППА-КАРРАГИНАН ВЫЗЫВАЕТ ЭНТЕРИТ

Харьковский национальный медицинский университет, г. Харьков

antontkachenko@mail.ru

В эксперименте показано, что месячное употребление крысами каппа-каррагинана *per os* приводит к морфологическим изменениям в кишечнике, характерным для развития хронического энтерита. Развитие воспаления подтверждается повышением содержания молекул средней массы, гаптоглобина и С-реактивного белка в сыворотке крови животных, употреблявших каррагинан. При анализе протеинограммы обнаружено, что месячное употребление каппа-каррагинана приводит к развитию гипергаммаглобулинемии, что указывает на подключение бактериального компонента.

**Ключевые слова:** каррагинан, каппа-каррагинан, хроническое воспаление, энтерит.

**Связь работы с научными программами, планами, темами.** Результаты, представленные в статье, получены в ходе проведения НИР «Вивчення віддалених наслідків регулярного споживання харчових продуктів, що містять генетично модифіковані організми, в умовах пошкодження епітеліального бар'єру шлунково-кишкового тракту», № государственной регистрации 0110 U000653.

**Введение.** Каррагинаны представляют собой полисахариды, выделенные из нескольких видов красных водорослей семейства *Rhodophyceae*. Уникальность данных гидроколлоидов заключается в чередующихся остатках галактозы и 3,6-ангидрогалактозы, которые соединены  $\alpha$ -1,3 и  $\beta$ -1,4-гликозидными связями. Характерной особенностью молекул каррагинанов является большое количество сульфатных групп [6]. Количество и место размещения остатков серной кислоты определяют тип, форму и функции каррагинанов. Выделяют три основных типа каррагинанов: лямбда, каппа и йота, каждый из которых активно применяется в производстве продуктов мясного, молочного и кондитерского ассортимента для улучшения микротекстуры продукции, в качестве желирующего агента, эмульгатора и загустителя [4]. При этом показано, что пероральный прием каррагинана лабораторными животными приводит к развитию воспаления желудочно-кишечного тракта [1, 5, 7,

8]. В то же время ряд авторов указывают на безопасность употребления каррагинана *per os* [6, 10]. Подобная путаница может быть обусловлена несовершенством терминологии. Некоторые авторы объединяют низкомолекулярные продукты гидролиза каррагинана – «полигинан» и «деградированный каррагинан», являющиеся безусловно токсичными, и нативный недеградированный пищевой каррагинан, который считается безопасным, под общим термином «каррагинан» [11]. Однако мы уже продемонстрировали способность пищевого лямбда-каррагинана вызывать энтерит у крыс при длительном пероральном употреблении [1, 5]. Следующим этапом стало изучение влияния нативного каппа-каррагинана (E407a), который используется в нашей стране непосредственно при производстве колбас и другой мясной продукции.

**Целью работы** было изучение особенностей морфологического состояния тонкого кишечника, белкового спектра сыворотки крови и некоторых маркеров воспаления при продолжительном пероральном употреблении загустителя каппа-каррагинана.

**Материалы и методы исследования.** Двадцать белых половозрелых крыс-самок популяции WAG были использованы при проведении эксперимента. Животные находились в стандартных условиях вивария. Крысы были в случайном порядке разделены на две группы: основную и контрольную. Каждая группа состояла из 10 животных. Животные основной группы, которые находились на стандартном рационе питания, получали 1% раствор пищевой добавки E407a в питьевой воде в течение месяца. Представители контрольной группы получали питьевую воду без каппа-каррагинана на фоне стандартного рациона питания.

Эксперимент проводили в соответствии с «Общими этическими принципами проведения экспериментов на животных», принятыми Первым Национальным конгрессом по биоэтике (Киев, Украина, 2001), VIII Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского Союза от

22.09.2010 г. по охране животных, используемых в научных целях, и положениями Европейской конвенции «О защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986). Этические аспекты исследования не вызвали нареканий со стороны комиссии по биоэтике ХНМУ.

Животных выводили из эксперимента путем декапитации под легким тиопенталовым наркозом (внутрибрюшинно 50 мг/кг веса). Непосредственно после проведения эксперимента производился забор крови для проведения биохимического исследования, и забирались фрагменты тонкого кишечника, которые подвергались перфузии физиологическим раствором. После фиксации в формалине и изготовления парафиновых срезов препараты тонкого кишечника окрашивались гематоксилин-эозином, галлоцианин-хромовыми квасцами по Ейнарсону, пикрофуксином по ван Гизон, ставилась ШИК-реакция [2]. Микроскопия препаратов тонкого кишечника осуществлялась на микроскопе «AxioStar plus» (Zeiss, ФРГ).

Для биохимического исследования использовали сыворотку крови. Белковый спектр сыворотки крови изучали турбидиметрическим методом с помощью набора реактивов фирмы «Филисит-Диагностика» (Украина). Концентрацию молекул средней массы (МСМ) в сыворотке крови определяли спектрофотометрическим скрининг-методом (Габриэлян Н. И. и др.). Сывороточные уровни С-реактивного белка и гаптоглобина определяли спектрофотометрически с помощью наборов фирмы «Филисит-Диагностика» (Украина) на биохимическом анализаторе «Stat Fax 303+».

Полученные данные статистически обрабатывались с помощью программы GraphPad Prism 5 с определением коэффициента Стьюдента.

**Результаты исследования и их обсуждение.**

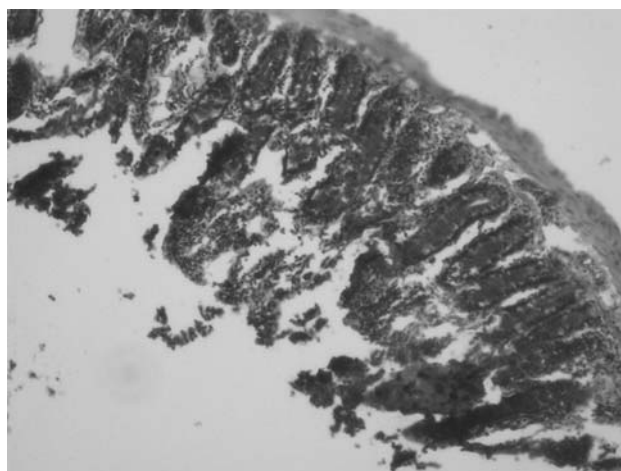
В ходе проведенного исследования нами было обнаружено достоверное повышение содержания таких маркеров воспаления как МСМ, гаптоглобин и С-реактивный белок в сыворотке крови животных основной группы. При этом содержание МСМ в сыворотке крови увеличивается в 5,7 раз по сравнению с контролем, гаптоглобина – в 1,9 раз, а С-реактивного белка – в 4,7 раза (табл. 1). Подобные изменения сывороточных концентраций биомаркеров воспаления указывают на наличие воспалительного процесса в организме. Принимая во внимание высокую молекулярную массу каппа-каррагинана, его стойкость к действию гидролитических ферментов и введение его в организм *per os* [7, 8], мы предположили, что воспалительный процесс локализован в пределах пищеварительного тракта.

**Таблица 1** – Содержание маркеров воспаления в сыворотке крови животных, употреблявших каппа-каррагинан

Параметр, единица измерения	Опытная группа (n=10)	Контрольная группа (n=10)
Молекулы средней массы (у.е.)	0,281 ± 0,015**	0,049 ± 0,002
С-реактивный белок (г/л)	10,55 ± 0,95**	2,25 ± 0,17
Гаптоглобин (г/л)	1,78 ± 0,08*	0,93 ± 0,05

**Примечания:** \* -  $p < 0,01$ ; \*\* -  $p < 0,001$  по сравнению с контрольной группой.

Гистологически обнаружено, что слизистая оболочка тонкой кишки существенно повреждена. Местами ворсинки абсолютно разрушены, в слизистой остались только железы. В других участках ворсинки дезэпителизованы, встречаются некротизированные ворсинки. Обращает внимание наличие большого количества бокаловидных клеток с большим содержанием муцина в эпителиальном покрове кишечных желез. Собственная пластинка слизистой расширена, содержит увеличенное количество макрофагов и лимфоцитов (рис.).



**Рис.** Стенка тонкого кишечника животного основной группы. Ворсины лишены эпителия, многие разрушены; собственная пластинка слизистой густо инфильтрирована лимфоцитами и макрофагами. ШИК-реакция. Ув. x100

Данные морфологического исследования указывают на повреждение эпителиального барьера и, как следствие, повышенную проницаемость стенки кишечника, что может способствовать вовлечению микрофлоры в патологический процесс. Такой механизм развития каррагинан-индуцированного воспаления кишечника мы предлагали для лямбда-каррагинана [3].

**Таблиця 2** – Белковый спектр сыворотки крови животных, употреблявших каппа-каррагинан (%)

Группа животных	Альбумины	$\alpha_1$ -глобулины	$\alpha_2$ -глобулины	$\beta$ -глобулины	$\gamma$ -глобулины
Контрольная группа (n=10)	49,74 $\pm$ 2,11	3,84 $\pm$ 0,22	8,75 $\pm$ 0,62	11,45 $\pm$ 1,03	26,22 $\pm$ 1,34
Основная группа (n=10)	46,23 $\pm$ 3,15 p > 0,05	3,17 $\pm$ 0,22 p < 0,05	5,36 $\pm$ 0,33 p < 0,02	14,09 $\pm$ 0,92 p < 0,01	31,15 $\pm$ 1,85 p < 0,001

Развитие воспалительного процесса в слизистой тонкого кишечника возможно и другими путями, а именно, если в “агрессивной” среде желудка все-таки происходит отщепление небольших фрагментов каррагинана, которые в роли гаптена формируют антиген. К тому же показано, что некоторые фрагменты каррагинана выступают в роли эпитопа [9]. В пользу такого варианта развития событий свидетельствует то, что энтерит характеризуется наличием макрофагально-лимфоцитарного инфильтрата в собственной пластинке слизистой, а не инфильтрата полиморфноядерно-микробного происхождения.

Результаты протеинограммы животных основной группы демонстрируют достоверное наличие гипергаммаглобулинемии на фоне снижения  $\alpha_1$ -,  $\alpha_2$ - и  $\beta$ -глобулинов, что явно указывает на наличие иммунного ответа на попадание в стенку кишечника микробного антигена или каррагинанового эпитопа (табл. 2). Схожие изменения со стороны белкового спектра сыворотке крови наблюдались и

при месячном употреблении лямбда-каррагинана [3].

Полученные результаты обосновывают актуальность дальнейшего вопроса изучения безопасности каппа-каррагинанов и разработку норм содержания добавки E407a в продуктах питания.

#### Выводы

Употребления каппа-каррагинана в течение одного месяца приводит к развитию энтерита, подтвержденного морфологически и биохимически.

Изменения в протеинограмме, а именно развитие гипергаммаглобулинемии, указывают на вероятное подключение бактериального компонента у животных с каппа-каррагинан-индуцированным энтеритом.

#### Перспективы дальнейших исследований.

Полученные данные обосновывают перспективу изучения влияния других типов нативного каррагинана на здоровье при пероральном употреблении, а также особенностей патогенеза каррагинан-индуцированного воспаления.

### References

- Gubina-Vakulik GI, Tkachenko AS, Orlova MA. Morphological condition of the small intestine after prolonged intake of food additive carrageenan. *Bulletin of Problems of Biology and Medicine*. 2014; 3 (109): 252–6. [Russian].
- Lilli P. *Pathohistological technique and practical histochemistry*. Moscow: Myr, 1969. 648 s. [Russian].
- Tkachenko AS, Gorbach TV, Ponomarenko OM. Features of blood serum protein and cytokine spectra in rats with chronic carrageenan-induced gastroenterocolitis. *Relevant Questions of Pharmaceutical and Medical Science and Practice*. 2014; 1 (14): 73-5. [Russian].
- Bhattacharyya S, Xue L, Devkota S, Chang E, Morris S, Tobacman JK. Carrageenan-induced colonic inflammation is reduced in Bcl10 null mice and increased in IL-10-deficient mice. *Mediators Inflamm*. 2013; 2013: 397642. PMID: 23766559. PMCID: PMC3677668. doi: 10.1155/2013/397642.
- Gubina-Vakyulyk GI, Tkachenko AS, Gorbach TV, Tkachenko MO. Damage and regeneration of small intestinal enterocytes under the influence of carrageenan induces chronic enteritis. *Comparative Clinical Pathology*. 2015; 24 (6): 1473-7. DOI: 10.1007/s00580-015-2102-3.
- McKim JM Jr, Baas H, Rice GP, Willoughby JA Sr, Weiner ML, Blakemore W. Effects of carrageenan on cell permeability, cytotoxicity, and cytokine gene expression in human intestinal and hepatic cell lines. *Food Chem Toxicol*. 2016 Oct; 96: 1-10. PMID: 27424122. doi: 10.1016/j.fct.2016.07.006.
- Necas J, Bartosikova L. Carrageenan: a review. *Veterinarni Medicina*. 2013; 58 (4): 187-205.
- Tobacman JK. Review of harmful gastrointestinal effects of carrageenan in animal experiments. *Environmental Health Perspectives*. 2001; 109 (10): 983–94.
- Tobacman JK. The common food additive carrageenan and the alpha-gal epitope. *J Allergy Clin Immunol*. 2015 Dec; 136 (6): 1708-9. doi: 10.1016/j.jaci.2015.08.048.
- Weiner ML. Food additive carrageenan: Part II: a critical review of carrageenan in vivo safety studies. *Crit Rev Toxicol*. 2014; 44: 244-69.
- Weiner ML, McKim JM, Blakemore WR. Addendum to Weiner, M.L. Parameters and pitfalls to consider in the conduct of food additive research, carrageenan as a case study. *Food Chemical Toxicology*. 2017 Sep; 107 (Pt A): 208-14. PMID: 28651808. doi: 10.1016/j.fct.2017.06.022.

УДК 577.114.4:616.34-002-092.9:665.939.35

**ПЕРОРАЛЬНЕ ВЖИВАННЯ ХАРЧОВОЇ ДОБАВКИ КАППА-КАРАГЕНАН  
ВИКЛИКАЄ ЕНТЕРИТ****Ткаченко А. С., Губіна-Вакулик Г. І., Горбач Т. В., Денисенко С. А., Оніщенко А. І.**

**Резюме.** У експерименті показано, що місячне вживання щурами каппа-карагенана рого призводить до морфологічних змін у кишечнику, характерних для розвитку хронічного ентериту. Розвиток запалення підтверджується підвищенням вмісту молекул середньої маси, гаптоглобіну і С-реактивного білка в сироватці крові тварин, які вживали карагенан. При аналізі протеїнограми виявлено, що місячне вживання каппа-карагенана призводить до розвитку гіпергаммаглобулінемії, що вказує на підключення бактеріального компонента.

**Ключові слова:** карагенан, каппа-карагенан, хронічне запалення, ентерит.

UDC 577.114.4:616.34-002-092.9:665.939.35

**Oral Intake of Kappa-Carrageenan Food Additive Causes Enteritis****Tkachenko A., Gubina-Vakyulyk G., Gorbach T., Denysenko S., Onishchenko A.**

**Abstract.** Carrageenans are polysaccharides isolated from several species of red algae of the *Rhodophyceae* family. Such hydrocolloids are formed by repeated residues of galactose and 3,6-anhydrogalactose. Carrageenan molecules are highly sulfated. The number and location of sulfate groups determine the type, form and functions of carrageenans. There are three main types of carrageenans: lambda, kappa and iota. All of them are actively used in the production of meat, dairy and confectionery products as gelling agents, emulsifiers, and thickeners. It has been shown *in vivo* that oral intake of carrageenan leads to the intestinal inflammation development. At the same time, opponents point out that carrageenan is safe. Our previous research demonstrated the ability of orally consumed lambda-carrageenan to induce enteritis in rats. The next stage is to study the impact of high-molecular-weight kappa-carrageenan (E407a), which is used in our country directly in the production of sausages and other meat products, on the body.

*The aim* of the research was to study the features of the morphological state of small intestine, blood serum protein spectrum and some markers of inflammation in rats which were orally provided with a thickener kappa-carrageenan.

*Materials and methods.* Twenty female white WAG rats were used in the experiment. They were randomly divided into two groups. Animals of the main group received 1% kappa-carrageenan solution daily orally for one month. Rats from the control group were provided with drinking water instead of carrageenan.

Paraffin sections of small intestine were stained with hematoxylin-eosin, Einarsson's gallocyanin-chrome alum, and van Gieson's picrofuchsin. PAS-reaction was performed. Levels of middle-weight molecules, c-reactive protein and haptoglobin in blood serum of animals were measured spectrophotometrically. Blood serum protein spectrum was determined turbidimetrically. The data obtained in the research were statistically processed using the Graph Pad Prism 5 application.

*Results and discussion.* A significant increase in the content of such markers of inflammation as middle-weight molecules, haptoglobin and C-reactive protein in the blood serum of the animals of the main group was found. The content of middle-weight molecules in serum was elevated 5.7 times in comparison with the control group. Haptoglobin levels were 1.9 times elevated, whereas C-reactive protein concentrations were 4.7 times higher. Such changes in serum concentrations of inflammation biomarkers indicate the development of the inflammatory process. The development of inflammation was proven morphologically. Analysis of blood serum protein spectrum revealed hypergammaglobulinemia, which might indicate the involvement of gut microflora in the inflammatory process.

*Conclusions.* Kappa-carrageenan intake for one month leads to the development of enteritis, confirmed morphologically and biochemically.

Changes in blood serum protein spectrum, namely the development of hypergammaglobulinemia, indicate the probable addition of the bacterial component to kappa-carrageenan-induced enteritis.

**Keywords:** carrageenan, kappa-carrageenan, chronic inflammation, enteritis.

Стаття надійшла 12.07.2017 р.

Рекомендована до друку на засіданні редакційної колегії після рецензування