

Ткаченко А.С., Мясоедов В.В., Наконечная О.А., Онищенко А.И.

Оценка экспрессии антиапоптотического белка B-cell lymphoma-2 (bcl-2) в лимфоцитах крыс при инкубации с полуочищенным каррагинаном

Харьковский национальный медицинский университет, Харьков,
Украина

В настоящее время в научном сообществе активную дискуссию вызывают вопросы безопасности пищевых добавок E407 (очищенный каррагинан) и E407a (полуочищенный каррагинан), которые широко используются в продуктах питания в качестве гелеобразователей и загустителей. Анализ литературы показал противоречивость данных относительно безопасности и токсичности пищевого каррагинана в экспериментах на животных. Опыты *in vitro* также не смогли внести ясности. Тем не менее, известно, что токсичность гетерополисахарида каррагинана зависит от молекулярной массы, которая варьируется в пределах 10-800 кДа, и степени сульфатированности моносахаридных фрагментов. Токсичность низкомолекулярных каррагинанов хорошо описана и они запрещены в пищевой промышленности. В то же время их высокомолекулярные аналоги продолжают использоваться. Одним из возможных механизмов токсичности каррагинанов является развитие окислительного стресса, который приводит к апоптозу клеток, интенсивность которого регулируется, в том числе и антиапоптотическим белком B-cell lymphoma-2 (bcl-2), ингибирующим активную кас-

пазу-3 и, как следствие, апоптоз. Показано, что каррагинаны не всасываются, однако они могут проникать внутрь иммунокомпетентных клеток в желудочно-кишечном тракте, что и обуславливает интерес к изучению их влияния именно на лейкоциты.

Целью работы явилось изучение интенсивности экспрессии белка B-cell lymphoma-2 (bcl-2) в лимфоцитах крыс на фоне краткосрочной инкубации клеток с пищевой добавкой E407a.

Материалы и методы. Эксперимент проводился на 8 половозрелых крысах популяции WAG. Кровь отбирали в вакутейнеры, содержащие ЭДТА. Затем отбирали три порции крови от каждого животного (по 500 мкл) для инкубации с 100 мкл натрий-фосфатного буфера (контроль), 2% и 5% растворами полуочищенного каррагинана в течение 2 часов. Затем отбиралось 100 мкл крови, которая лизировалась (FACSLyse solution, Becton Dickinson, США) и отмывалась (PBS, pH 7.4; Becton Dickinson, США) дважды для получения суспензии лейкоцитов (Becton Dickinson Technical Support Protocol, 2002). Отмытые лейкоциты инкубировали с FITC-мечеными антителами к bcl-2 (FITC mouse anti-Bcl-2, BD Pharmingen™, США) с предварительной фиксацией и пермеабиллизацией (Fixation/Permeabilization Solution Kit, BD Cytotfix/Cytoperm™, США). Образцы анализировались на проточном цитометре BD FACSCanto™ II (Becton Dickinson, США).

Результаты. Регион лимфоцитов гейтировали на основании комбинации прямого и бокового светорассеивания и анализировали количество bcl-2⁺-клеток, а также среднюю интенсивность флуоресценции (MFI). Установлено, что инкубация лимфоцитов с полуочищенным каррагинаном не приводила к изменению количества клеток, экспрессирующих белок bcl-2 ($p > 0.05$). Однако анализ уровня экспрессии bcl-2 в bcl-2⁺-лимфоцитах путем сравнения значений MFI показал статистически достоверное увеличение экспрессии bcl-2 приблизительно на 25% в обеих опытных группах на фоне контроля ($p < 0.05$). MFI в контрольной группе равнялось 236 [221; 261] у.е., в то время как при инкубации данный параметр достигал 291 [274; 306] у.е. и 296 [280; 311] у.е. (2% и 5%). В то же время нами было показано, что инкубация с каррагинаном в схожих условиях не проводила к активации каспазы-3 и, как следствие, апоптозу лимфоцитов. Мы можем предположить, что кратковременная инкубация лимфоцитов с полуочищенным каррагинаном изначально приводит к гиперэкспрессии bcl-2 с целью предотвращения гибели клеток, поскольку известно, что bcl-2 ингибирует каспазу-3 и предотвращает апоптоз. Однако мы полагаем, что необходимо дальнейшее изучение особенностей взаимодействия меж-

Республиканская конференция с международным участием, посвященная 80-летию со дня рождения Т. С. Морозкиной: ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКАЯ БИОЛОГИЯ КАК ОСНОВА СОВРЕМЕННОЙ МЕДИЦИНЫ, Минск, 29 мая 2020 г.

ду проапоптотическими и антиапоптотическими факторами для определения дальнейшей судьбы клетки под влиянием каррагинанов.

Выводы. Инкубация лимфоцитов с полуочищенным каррагинаном приводит к гиперэкспрессии антиапоптотического белка bcl-2.