

К 61:612.017:615.371

**СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗНА АКТИВНІСТЬ
ТА ВМІСТ ФЕРМЕНТАТИВНО-АКТИВНОГО
ЦЕРУЛОПЛАЗМІНУ СИРОВАТКИ КРОВІ
ЩУРІВ РІЗНОГО ВІКУ ЗА УМОВ ІМУНІЗАЦІЇ
АДП-АНАТОКСИНОМ**

**Волянський А.Ю., Никитченко Ю.В.,
Симиренко Л.Л., Кучма І.Ю.**

ІМІ ім. І.І. Мечникова АМН України

Вступ

Інтенсивність вільнорадикальних процесів пов'язана з імунним статутом організму [1, 2]. Вікові зміни імунітету, які є основою різних захворювань при старінні, можуть бути також причиною активації процесу вільнорадикального окислення на пізніх етапах онтогенезу [3, 4]. Зростання з віком рівня активних форм кисню може викликати зміни конформаційної організації білків з експансією схованих антигенних епітопів та придбанням ними нових імуногенних властивостей [2]. Відповідно вільнорадикальної теорії старіння [3 - 5] з віком знижується активність ряду антиоксидантних ферментів [6, 7] і концентрації природних антиоксидантів [8, 9], що може зумовлювати особливості реакції відповіді на імунізацію. Процес формування антиоксидантної імунної відповіді на дифтерійний і правцевий анатоксини АДП-вакцини з віком щурів уповільнюється, знижується рівень специфічного антитілогенезу [10 - 12]. Зважаючи на те, що стан прооксидантно-антиоксидантної системи та імунний статус організму виражено пов'язані з віком, дослідження активності ферментів, що утилізують супероксидні радикали, за умов імунізації може надати вагомую інформацію щодо розробки додаткових тестів для раннього визначення вікових особливостей розвитку імунного процесу.

Матеріали і методи

Експеримент проводився на щурах лінії Вістар 1-, 3-, 12-, 20-, 24- і 32-місячного віку (7 - 8 тварин у кожній групі). Щурів 3- та 20-місячного віку було імунізовано АДП-анатоксином. У досліді по імунізації було 14 груп тварин: 1 та 8 групи були контрольними (3- та 20-ти місячного віку відповідно), 2 - 7 групи – піддослідні 3-місячні щури, 9 – 14 групи – піддослідні 20-місячні щури. Щури 2 та 9 груп отри-

мували 0,25 мл фізіологічного розчину; іншим піддослідним тваринам вводили АДП-анатоксин в дозі 15 ЛФ дифтерійного та 5 ОЗ правцевого анатоксинів у 0,25 мл препарату. Цю дозу як мінімально ефективну було обрано у попередньому дослідженні при розробці моделі імунної відповіді на АДП-анатоксин [13]. Вакцину вводили підшкірно, о 10 годині ранку. Кожна група складалася з трьох тварин. Дослідження проводили у динаміці розвитку імунної відповіді: до імунізації та через 3, 7, 14, 21 та 28 днів після щеплення. Кров для аналізу у тварин відбирали після декапітації. Тварин 1, 2, 8 та 9 груп забивали на 3-тню добу після імунізації.

Метод дослідження супероксиддисмутазної активності (СОД) сироватки крові полягає у визначенні ступеню інгібіції реакції відновлення нітротетразолію синього супероксидними радикалами, які генеруються з певною швидкістю в ксантин-ксантинооксидазній реакції [14]. За одиницю СОД приймали 50%-не інгібування швидкості відновлення нітротетразолію синього при температурі 37°C. СОД реєстрували при 560 нм на двопробеновому спектрофотометрі Specord UV VIS (Німеччина) і розраховували в умовних одиницях (ум. од.) активності на 1 мл сироватки крові.

Вміст ферментативно-активного церулоплазміну (ЦП) сироватки крові визначали у середовищі, яке містило 0,1 М ацетатного буферу, рН 5,5, та 0,1 % парафенілендіамін [15]. Активність забарвлених зразків реєстрували на спектрофотометрі Specord UV VIS (Німеччина) при 530 нм, вміст ЦП означали в одиницях оптичної щільності (ОЩ) при 530 нм на 1 мл сироватки крові. Статистичну обробку результатів дослідження виконували на ПК за допомогою пакету прикладних програм "Excel". Експеримент виконано у відповідності до Європейської конвенції з питань етики по захисту хребетних тварин, яких використовують для експериментальних та наукових цілей (Страсбург, 1986 р.).

Результати досліджень та їх обговорення

Результати визначення вікових особливостей змін супероксиддисмутазної активності та вмісту ферментативно-активного церулоплазміну в сироватці крові досліджених щурів наведено в таблиці 1.

Таблиця 1. Супероксиддисмутазна активність і вміст ферментативно-активного церулоплазміну сироватки крові щурів різного віку

Вік, міс.	Показники		
	СОД, ум. од./мл сироватки	ЦП, од. ОЩ/мл сироватки	Відношення СОД/ЦП, ум. од.
1	219,2±17,0	12,6±1,1	17,4
3	274,2±20,8	17,8±0,7*	15,5
12	365,3±12,7***	32,9±2,6***	11,1
24	277,4±16,3****	25,3±2,6***	11,0
32	278,1±15,1****	21,6±1,2***,****	12,9

Примітки: * - P < 0,05 у порівнянні з 1-місячними щурами; ** - P < 0,05 у порівнянні з 3-місячними щурами; *** - P < 0,05 у порівнянні з 12-місячними щурами.

СОД у 12-місячних тварин зростала на 167% відносно рівня у 1-місячних щурів. В подальшому, в

24- та 32-місячному віці, активність ферменту дещо знижувалась. При цьому, за абсолютним рівнем супе-

роксиддисмутазна активність у старих та дуже старих щурів залишалась вірогідно вищою, ніж у молодих нестатевозрілих тварин. Подібна вікова спрямованість виявлена також при дослідженні вмісту ферментативно-активного церулоплазміну. У цьому випадку вивчаєми показник зростав до 12-місячного віку на 261% (табл. 1), а у тварин 32-місячного віку істотно знижувався, але залишався вірогідно вищим рівня у 1-місячних тварин. Відношення супероксиддисмутазної активності до церулоплазміну (СОД/ЦП), що визначають надійним показником стану першого рівню ферментативного захисту організму за умов розвитку

деяких патологій [16], з віком тварин істотно знижувалось. Це може свідчити про зниження внеску супероксиддисмутазної активності в процес регулювання рівня активних форм кисню в тканинах при старінні тварин.

Визначено суттєві особливості зміни супероксиддисмутазної активності та вмісту ферментативно-активного церулоплазміну в сироватці крові щурів різного віку в контролі та в процесі формування імунної відповіді до дифтерійного та правцевого анатоксинів у складі АДП-анатоксину (табл. 2, 3).

Таблиця 2. Динаміка змін супероксиддисмутазної активності та вмісту ферментативно-активного церулоплазміну сироватки крові 3-місячних щурів за умов імунізації АДП-анатоксином.

Термін після імунізації, доба	Показники		
	СОД, ум. од./мл сироватки	ЦП, од. ОШ/мл сироватки	Відношення СОД/ЦП, ум. од.
До імунізації (контроль)	271,0 ± 10,4	16,1 ± 1,5	16,8
3	273,4 ± 14,0	26,9 ± 4,2*	10,2
7	305,1 ± 14,7*	21,1 ± 1,6*	14,5
14	242,2 ± 11,7**	18,1 ± 2,1	13,4
21	232,9 ± 18,0**	15,0 ± 1,4**	15,5
28	257,2 ± 41,3	17,7 ± 4,3	14,5

Примітки: * - $P < 0,05$ у порівнянні з контрольною групою; ** - $P < 0,05$ у порівнянні з 7 добою після імунізації.

Встановлено, що у 3-місячних щурів супероксиддисмутазна активність сироватки крові істотно не змінювалась на 3 добу після введення фізіологічного розчину та АДП-анатоксину. На 7 добу СОД дещо зростала ($0,05 < P < 0,1$) у порівнянні з контрольною групою тварин. На 14 добу після введення АДП-вакцини активність досліджуемого ферменту значно знижувалась відносно рівня на 7 добу. Виявлено також, що і на 21 добу після щеплення введення АДП-вакцини супероксиддисмутазна активність була вірогідно нижче у порівнянні з рівнем на 7 добу. При цьому слід підкреслити, що за абсолютним значенням активність СОД на 14 та 21 добу після імунізації вірогідно не відрізнялась від активності в контрольній групі. На 28 добу після введення препарату активність ферменту вірогідно не відрізнялась від рівня у всіх інших експериментальних груп тварин молодого віку.

Активність іншого ферменту, який здатен ефективно утилізувати супероксидний радикал у крові – церулоплазміну, у відповідь на імунізацію у 3-місячних щурів проявляла більш виразні зміни, ніж активність супероксиддисмутази (табл. 2). Так, вже на 3 добу після імунізації вміст ЦП збільшувався на 167 % відносно рівня до імунізації. Істотно підвищеною активність церулоплазміну була і на 7 добу після введення препарату. В подальшому, на 14, 21 та 28 добу, вміст цього ферменту знижувався до рівня у контрольних щурів. Відношення СОД/ЦП у молодих тварин на 3 добу після імунізації знижувалося на 61 %, а в подальшому поверталось практично до рівня у контрольних щурів.

При дослідженні супероксиддисмутазної активності сироватки крові старих щурів виявлено, що вона декілька знижувалась на 3 та 7 добу після імуні-

зації, після чого зростала до рівня у контрольних 20-місячних тварин (табл. 3). Слід підкреслити, що на 14 добу після введення АДП-вакцини СОД сироватки крові старих щурів була вірогідно вищою у порівнянні з рівнем на 3 та 7 добу експерименту (табл. 3), а у молодих тварин на 14 та 21 добу була вірогідно нижчою у порівнянні з ранніми термінами (7 доба) експерименту (табл. 2).

Вміст церулоплазміну в сироватці крові старих щурів у відповідь на введення АДП-анатоксину вірогідно зростав на 14 добу експерименту та в подальшому декілька знижувався (табл. 3). І в даному випадку слід відмітити, що у молодих тварин активність церулоплазміну, як і супероксиддисмутази, була максимальною на більш ранніх термінах експерименту (табл. 2). Відношення СОД/ЦП в сироватці крові старих тварин на 7 – 28 добу після імунізації було знижено у порівнянні з контрольними тваринами. При цьому треба підкреслити, що за абсолютним рівнем значення цього показника у старих тварин було значно нижчим, ніж у молодих, 3-місячних, тварин (табл. 2 і 3).

Таким чином встановлено, що у молодих і старих щурів формування специфічної імунної відповіді на АДП-анатоксин супроводжується достовірними розходженнями в рівні супероксиддисмутазної активності та у вмісту ферментативно-активного церулоплазміну у сироватці крові, що свідчить про доцільність вивчення цих показників при формуванні гуморальної поствакцинальної імунної відповіді з метою розробки додаткових біохімічних тестів для раннього визначення вікових особливостей імунного процесу.

Таблиця 3. Динаміка змін супероксиддисмутазної активності та вмісту ферментативно-активного церулоплазміну сироватки крові 20-місячних щурів за умов імунізації АДП-анатоксином.

Термін після імунізації, доба	Показники		
	СОД, ум. од./мл сироватки	ЦП, од. ОШ/мл сироватки	Відношення СОД/ЦП, ум. од.
До імунізації (контроль)	277,4 ± 16,3	29,1 ± 2,4	9,5
3	231,5 ± 18,1	26,9 ± 3,9	8,6
7	245,2 ± 5,2	34,2 ± 3,6	7,2
14	291,6 ± 14,3*	37,1 ± 1,7**	7,9
21	284,4 ± 16,6	30,3 ± 6,2	7,4
28	256,2 ± 4,7	34,0 ± 0,3	7,5

Примітки: * - P < 0,05 у порівнянні з 3 та 7 добою після імунізації; ** - P < 0,05 у порівнянні з контрольною групою.

Висновки

1. Активність ферментів, що утилізують супероксидні радикали, сироватки крові щурів залучено у процес формування антиоксидантної імунної відповіді на АДП-вакцину.
2. Супероксиддисмутазна активність та вміст ферментативно-активного церулоплазміну у сироватці крові щурів мають вікові розбіжності як до імунізації, так і у динаміці процесу формування імунної відповіді на АДП-анатоксин.

Перелік посилань

1. Садовникова И.П. Влияние геропротекторов-антиоксидантов на иммунные реакции // «Итоги науки и техники ВИНТИ. Общие проблемы биологии», 1986.-№ 5.-С. 69-109.
2. Гольцев А.Н., Козлова Ю.А., Бабенко Н.Н., Овсянников С.Е., Никитченко Ю.В. Особенности изменения иммунологических и биохимических показателей организма с экспериментальным аллергическим энцефаломиелитом // Проблемы криобиологии.-2004.-№ 1.-С. 41-49.
3. Emanuel N.M. Kinetics and free-radical mechanisms of ageing and carcinogenesis // Age-related factors in carcinogenesis. Likhachev A., Anisimov V., Montesano R., Eds. (IARC Sci. Publ. N 58). IARC: Lyon.-1985.-P. 127-149.
4. Harman D. Free-radical theory of aging: increasing the functional life span // Ann. N.Y. Acad. Sci.-1994.-V. 717.-P. 1-15.
5. Обухова Л.К. Вклад академика Н.М. Эмануэля в развитие отечественной геронтологии: свободнорадикальные механизмы в процессе старения // Успехи геронтол.-1999.-Вып. 3.-С. 27-31.
6. Glutathione metabolism in heart and liver of the aging rat / M. Stio, T. Iantomasi, F. Farilli et al. // Biochem. Cell Biol.-1993.-V. 72.-P. 58-61.
7. Tian L., Cai Q., Wei H. Alterations of antioxidant enzymes and oxidative damage to macromolecules in different organs of rats during aging // Free Radic. Biol. Med.-1998.-V. 24, N 9.-P. 1477-1484.
8. Изменение антиокислительной активности липидов при старении / Е.Б. Бурлакова, Е.М. Молочкина, Н.П. Пальмина, Л.В. Слепухина // Вопр. мед. химии.-1976.-Т. 22, N 4.-С. 541-546.
9. Паранич А.В. Возрастные особенности становления и стабилизации антиокислительного гомеостаза у

крыс // Биологический вестник.-1997.-Т. 1, N 2.-С. 43-47.

10. Волянський А.Ю., Симиренко Л.Л., Кучма І.Ю., Никитченко Ю.В., Крестецька С.Л. Вікові особливості глюкокортикоїдного статусу щурів за умов імунізації АДП-анатоксином // Биологический вестник.-2006.-Т. 10.-№ 2.-С. 113-116.
11. Волянський А.Ю., Симиренко Л.Л., Палій І.Г., Кучма І.Ю., Никитченко Ю.В. Вікові особливості тиреоїдного статусу щурів за умов імунізації АДП-анатоксином // Biomedical and Biosocial Anthropology.- 2006.-№ 7.-P. 159-164.
12. Волянский А.Ю. Влияние АДП-анатоксину на глюкокортикоидный статус щурів різного віку // Аналі Мечниківського інституту.-2006.-№ 3.-Web: <http://hniimi.da.ru.-Journal>.
13. Волянський А.Ю., Симиренко Л.Л., Кучма І.Ю., Никитченко Ю.В., Крестецька С.Л. Моделювання процесу специфічного антилітогенезу за умов імунізації щурів АДП-анатоксином // Інфекційні хвороби.-2006.-№ 4.-С. 62-66.
14. Beavchamp C., Fridovich I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels // Anal. Biochem.-1971.-V. 44, N 1.-P. 276-287.
15. Активность церулоплазмينا крови при прогрессирующих заболеваниях центральной нервной системы / Г.И. Мжельская, И.А. Завалишин, И.А. Иванова-Смоленская и др. // Лаб. дело.-1989.-№ 11.-С. 12-16.
16. Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты / Меньшикова Е.Б., Ланкин И.З., Зенков Н.К., Бондарь И.А., Круговых Н.Ф., Труфакин В.А.-М.: Фирма «Слово», 2006.-556 с.

УДК 61:612.017:615.371

СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗНА АКТИВНІСТЬ ТА ВМІСТ ФЕРМЕНТАТИВНО-АКТИВНОГО ЦЕРУЛОПЛАЗМІНУ СИРОВАТКИ КРОВІ ЩУРІВ РІЗНОГО ВІКУ ЗА УМОВ ІМУНІЗАЦІЇ АДП-АНАТОКСИНОМ
Волянський А.Ю., Никитченко Ю.В., Симиренко Л.Л., Кучма І.Ю.

Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова АМН України

Досліджено супероксиддисмутазну активність та вміст ферментативно-активного церулоплазміну сироватки крові інтактних самців шурів лінії Вістар 1-, 3-, 12-, 24-, 32-місячного віку та динаміку зміни цих показників у шурів 3- та 20-місячного віку у процесі формування імунної відповіді до дифтерійного та правцевого анатоксинів за умов щеплення АДП-вакциною. Активність ферментів, що утилізують супероксидні радикали, характеризувалася віковими особливостями як до імунізації, так і у динаміці імунної відповіді на вакцинацію.

Ключові слова: супероксиддисмутаза, церулоплазмін, АДП-анатоксин, шури, вік.

УДК 61:612.017:615.371
СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ И СОДЕРЖАНИЕ ФЕРМЕНТАТИВНО-АКТИВНОГО ЦЕРУЛОПЛАЗМИНА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ КРЫС РАЗНОГО ВОЗРАСТА ПРИ ИММУНИЗАЦИИ АДП-АНАТОКСИНОМ
Волянский А.Ю., Никитченко Ю.В., Смирненко Л.Л., Кучма И.Ю.

Институт микробиологии и иммунологии им. И.И. Мечникова АМН Украины

Исследовали супероксиддисмутазную активность и содержание ферментативно-активного церулоплазмина в сыворотке крови интактных самцов крыс линии Вистар 1-, 3-, 12-, 24- и 32-месячного возраста и динамику изменения этих показателей у крыс 3- и 20-месячного возраста в процессе формирования иммунного ответа к дифтерийному и столбнячному анатоксинам в составе АДС-вакцины. Активность ферментов, утилизирующих супероксидные радикалы, характеризовалась возрастными особенностями как до иммунизации, так и в динамике иммунного ответа на вакцинацию.

Ключевые слова: супероксиддисмутаза, церулоплазмин, АДС-анатоксин, крысы, возраст.

УДК 61:612.017:615.371
SUPEROXIDE DISMUTASE ACTIVITY AND ENZYMATICALLY ACTIVE CERULOPLASMIN CONTENT IN BLOOD SERUM OF DIFFERENT AGE RATS IN CONDITIONS OF ADT-ANATOXIN IMMUNIZATION

Volyanskiy A.Y., Nikitchenko Yu.V., Simirenko L.L., Kuchma I.Y.

The Mechnikov Institute of Microbiology and Immunology Academy of Medical sciences

Superoxide dismutase activity and enzymatically active ceruloplasmin content in blood serum of 1-, 3-, 12-, 24- and 32-month old control male Wistar rats, and dynamics of change of these parameters in 3- and 20-month old rats during the forming of antitoxic immunity to diphtheria and tetanus anatoxins under immunization by ADT-vaccine were investigated. The activity of enzymes utilizing superoxide radicals characterizes by age peculiarities both before immunization and in dynamics of immune response to vaccination.

Key words: superoxide dismutase, ceruloplasmin, ADT-anatoxin, rats, age.