

УДК 61:612.017:615.371

**ВЛИЯНИЕ 1-МЕТИЛ-2-
МЕРКАПТОИМИДАЗОЛА НА СОСТОЯНИЕ
ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНОЙ
СИСТЕМЫ КРОВИ КРЫС ПРИ ИММУНИЗА-
ЦИИ АДС-АНАТОКСИНОМ**

**Волянский А.Ю., Никитченко Ю.В., Кучма И.Ю.,
Смирненко Л.Л.**

**ГП «Институт микробиологии и иммунологии им.
И.И. Мечникова АМН Украины», ул. Пушкин-
ская 14, г. Харьков, 61057, imiamn@mail.ru**

Известно, что состояние системы иммунитета в значительной степени зависит от гормонального статуса и состояния прооксидантно-антиоксидантной системы организма [1, 2]. Нами показано, что процесс формирования иммунного ответа на дифтерийный и столбнячный анатоксины в составе АДС-вакцины тесно связан с изменением тиреоидного статуса и прооксидантно-антиоксидантного баланса крови крыс [3 – 6]. В частности, показано, что активность ряда антиоксидантных ферментов крови подопытных животных при моделировании повышенного уровня тироксина в организме (перееданием в раннем постнатальном онтогенезе) снижалась [5], а при моделировании пониженного уровня тиреоидных гормонов (калорийно ограниченной диеты) достоверно увеличивалась [6]. Снижение или увеличение активности антиоксидантных ферментов крови обнаружено нами и при введении крысам экзогенного тироксина или антитиреоидного препарата мерказолила [7, 8].

В связи с тем, что состояние прооксидантно-антиоксидантной системы тесно связаны с тиреоидным и иммунным статусом организма, целью работы определено исследование влияния антитиреоидного препарата 1-метил-2-меркаптоимидазола (мерказолила) на содержание продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) и активность антиоксидантных ферментов крови крыс при иммунизации АДС-анатоксином, что может быть использовано для усовершенствования критериев оценки эффективности иммунизации.

Материалы и методы

Исследование влияния 1-метил-2-меркаптоимидазола (ММИ) (ФК «Здоровье», Украина) на состояние прооксидантно-антиоксидантного баланса крови в процессе формирования иммунного ответа к дифтерийному и столбнячному анатоксином в составе АДС-вакцины проводили на 3-месячных крысах-самцах линии Вистар, которое выполнено с соблюдением правил Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и научных целей (Страсбург, 1986 г). В опыте было 3 группы животных: 1 группа – контрольная (7 особей), крысам вводили физиологический раствор внутривенно 1 раз в сутки в объеме 0,15 мл на 100 г массы тела; вторая и третья группы – подопытные животные (34 особи), которым в течение

всего эксперимента вводили внутривенно 1 раз в сутки ММИ в дозе 1 мг на 100 г массы тела. Подопытным крысам третьей группы после десятого дня введения мерказолила вводили АДС-анатоксин подкожно однократно в дозе 15 ЛФ дифтерийного и 5 ЕС столбнячного анатоксинов в 0,25 мл препарата. Эта доза как минимально эффективная была заранее определена при разработке модели иммунного ответа на АДС-анатоксин [9].

Крыс выводили из опыта декапитацией под легким эфирным наркозом через 3, 7, 14, 21 и 28 суток после иммунизации, что соответствовало 13, 17, 24, 31 и 38 суткам введения ММИ. Контрольных животных декапитировали через 13 суток введения физиологического раствора. Кровь собирали, получали сыворотку и хранили ее на холоду до использования в опыте.

Измерение концентрации гидроперекисей липидов проводили по методу Asakawa et al. [10]. Спектр поглощения окрашенного продукта регистрировали на двухлучевом спектрофотометре Specord UV VIS и разницу экстинкций измеряли при 535 и 520 нм. Содержание гидроперекисей липидов рассчитывали в эквивалентных количествах малонового диальдегида (МДА) соответственно коэффициенту молярной экстинкции $1,56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Глутатионпероксидазную активность (КФ 1.11.1.9) определяли по методу [11] в 50 мМ K^+ , Na^+ -фосфатном буфере (рН 7,4), содержащем 1 мМ ЭДТА, 0,1 мМ NADPH, 1 ед. глутатионредуктазы дрожжей, 0,4 мМ перекиси водорода, 0,2%-ный тритон X-100 и 2 мМ азида Na для ингибирования каталазы. Реакцию проводили при температуре 37 °С и постоянном перемешивании. Глутатионпероксидазную активность регистрировали при 340 нм на двухлучевом спектрофотометре Specord UV VIS (Германия). Активность выражали в мкмоль NADPH/мин.мл сыворотки с учетом коэффициента молярной экстинкции $6,22 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Супероксиддисмутазную активность (КФ 1.15.1.1) определяли, как описано в работе [12]. Метод состоит в определении степени ингибирования реакции восстановления нитротетразолия синего супероксидными радикалами, которые генерируются с определенной скоростью в ксантин-ксантинооксидазной системе. Супероксиддисмутазную активность измеряли в среде, содержащей 50 мМ K^+ , Na^+ -фосфатный буфер (рН 7,8), 50 мМ Na_2CO_3 , 0,1 мМ ЭДТА, 25 мкМ нитротетразолия синий, 0,1 мМ ксантин, 0,003 ед. ксантинооксидазы. За единицу супероксиддисмутазной активности принимали 50%-ное ингибирование скорости восстановления нитротетразолия синего при температуре 37 °С. Супероксиддисмутазную активность регистрировали при 560 нм на двухлучевом спектрофотометре Specord UV VIS (Германия) и рассчитывали в единицах активности на 1 мл сыворотки крови.

Содержание ферментативно-активного церулоплазмينا (КФ 1.16.3.1) определяли согласно рекомендациям в работе [13] с использованием среды,

содержащей 0,1 М ацетатного буфера (рН 5,5) и 0,1%-ный парафенилендиамин. Сыворотку крови добавляли в количестве 0,02 мл на 2 мл реакционной среды. Длительность инкубации – 1 час при температуре 37 °С. Реакцию останавливали добавлением 0,01%-ного азида натрия. Оптическую плотность окрашенных образцов регистрировали на двулучевом спектрофотометре Specord UV VIS (Германия) при 530 нм, содержание церулоплазмينا выражали в нмоль на 1 мл сыворотки крови.

Статистическую обработку результатов исследования проводили на ПК с использованием пакета прикладных программ "Excel". Достоверно разными считались результаты при $P < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Содержание гидроперекисей липидов в сыворотке крови крыс, получавших в течение 13 суток ММИ, было достоверно ниже (на 21,1 %), чем у контрольных животных (табл. 1). В дальнейшем, через

17 суток введения этого препарата, снижающего концентрацию тиреоидных гормонов в организме, содержание гидроперекисей липидов в сыворотке крови подопытных животных дополнительно снижалось. Обнаруженное снижение продуктов ПОЛ в сыворотке крови подопытных животных в какой-то мере согласуется с данными других авторов [8], которые показали значительное снижение интенсивности ПОЛ в печени крыс, получавших в течение 10 суток ММИ.

При более длительном введении ММИ (24 и 31 сут.) содержание гидроперекисей липидов в сыворотке подопытных животных нормализовалось. Введение на фоне ММИ АДС-анатоксина не оказывало существенного влияния на динамику изменения концентрации гидроперекисей липидов крови.

Активность фермента, утилизирующего гидроперекиси липидов, - глутатионпероксидазы, значительно увеличивалась (на 79,9 %) к 17 суткам введения ММИ и в дальнейшем лишь сохраняла эту тенденцию до 31 суток эксперимента.

Таблица 1. Влияние 1-метил-2-меркаптоимидазола на содержание гидроперекисей липидов и глутатионпероксидазную активность в сыворотке крови крыс при иммунизации АДС-анатоксином (М ± m)

Варианты опыта	Гидроперекиси липидов, нмоль МДА/мл	Глутатионпероксидаза, мкмоль NADPH/мин·мл
Контроль	2,98 ± 0,19	1,39 ± 0,16
ММИ, 13 сут	2,35 ± 0,09*	2,15 ± 0,44
ММИ, 13 сут + АДС	2,66 ± 0,27	1,25 ± 0,30
ММИ, 17 сут	1,99 ± 0,20*	2,50 ± 0,30*
ММИ, 17 сут + АДС	2,02 ± 0,23*	1,88 ± 0,30
ММИ, 24 сут	2,52 ± 0,36	2,58 ± 0,33*
ММИ, 24 сут + АДС	3,03 ± 0,51	2,63 ± 0,49*
ММИ, 31 сут	2,62 ± 0,18	3,66 ± 0,28*
ММИ, 31 сут + АДС	2,32 ± 0,22	2,69 ± 0,27***
ММИ, 38 сут + АДС	2,68 ± 0,16	4,24 ± 0,56*

Примечания: * – $P < 0,05$ по сравнению с контролем; ** – $P < 0,05$ по сравнению с соответствующей группой животных, получавших только ММИ.

Приведенные результаты согласуются с ранее полученными нами данными о значительном увеличении глутатионпероксидазной активности в крови "типокалорийных" крыс, у которых уровень тиреоидных гормонов был значительно сниженным [6]. Важно отметить, что введение экзогенного тироксина "типокалорийным" животным приводило к достоверному снижению глутатионпероксидазной активности [14].

Введение АДС-анатоксина на фоне ММИ приводило к некоторому замедлению увеличения глутатионпероксидазной активности крови подопытных животных, которое наиболее выраженным оказалось на 21 сутки после иммунизации, т.е. на 31 день после начала эксперимента. Такие особенности изменения глутатионпероксидазной активности в крови крыс, получавших на фоне ММИ АДС-анатоксин могут объясняться изменением концентрации тиреоидных гормонов в организме иммунизированных животных. В частности, нами ранее показано, что у эу-

тиреоидных 3-месячных животных концентрация T_3 и T_4 в сыворотке крови в ответ на введение АДС-анатоксина существенно увеличивалась к 7 суткам после иммунизации и в дальнейшем к 21 суткам эксперимента нормализовалась [4].

Активность супероксиддисмутазы – фермента, утилизирующего супероксидные радикалы, в ответ на введение ММИ и на совместное введение ММИ и АДС-анатоксина существенно не изменялась в течение всего эксперимента (табл. 2).

Содержание ферментативно-активного церулоплазмينا – второго белка сыворотки крови, способного эффективно утилизировать супероксидные радикалы, - в ответ на введение ММИ достоверно снижалось к 13 и 17 суткам эксперимента, а затем значительно увеличивалось.

У подопытных животных, получавших на фоне ММИ АДС-анатоксин, содержание ферментативно-активного церулоплазмينا достоверно снижалось только к 17 суткам эксперимента, что соответ-

вовало 7 суткам после введения вакцины. Отсутствие снижения концентрации церулоплазмينا на ранних сроках (через 3 суток после введения АДС-анатоксина) эксперимента может объясняться тем, что у эутиреоидных 3-месячных крыс в этот срок по-

сле вакцинации содержание исследуемого белка крови было значительно выше, чем у контрольных животных [3].

Таблица 2. Влияние 1-метил-2-меркаптоимидазола на супероксиддисмугазную активность и содержание ферментативно-активного церулоплазмينا в сыворотке крови крыс при иммунизации АДС-анатоксином (M ± m)

Варианты опыта	Супероксиддисмугаза, усл. ед./мл	Церулоплазмин, нмоль/мл
Контроль	263,9 ± 7,5	1,08 ± 0,06
ММИ, 13 сут	284,6 ± 34,4	0,77 ± 0,11*
ММИ, 13 сут + АДС	277,8 ± 23,0	1,25 ± 0,19
ММИ, 17 сут	284,9 ± 42,7	0,74 ± 0,09*
ММИ, 17 сут + АДС	289,3 ± 11,9	0,82 ± 0,10*
ММИ, 24 сут	288,9 ± 34,3	1,06 ± 0,06
ММИ, 24 сут + АДС	267,7 ± 10,4	1,54 ± 0,17***
ММИ, 31 сут	270,2 ± 14,7	1,75 ± 0,16*
ММИ, 31 сут + АДС	270,1 ± 26,6	1,72 ± 0,04*
ММИ, 38 сут + АДС	270,3 ± 25,3	1,58 ± 0,10*

Примечания: * – P < 0,05 по сравнению с контролем; ** – P < 0,05 по сравнению с соответствующей группой животных, получавших только ММИ.

В дальнейшем к 24, 31 и 38 суткам после введения ММИ и АДС-анатоксина содержание ферментативно-активного церулоплазмينا в крови подопытных крыс увеличивалась на 43, 59 и 46 % соответственно (по сравнению с контролем). При этом следует отметить, что степень увеличения содержания этого белка крови иммунизированных крыс была выше, чем у животных, получавших один ММИ (табл. 2).

В целом, полученные данные свидетельствуют, что введение животным антитиреоидного препарата ММИ (мерказолила) приводит к снижению содержания гидроперекисей липидов на 13 и 17 сутки эксперимента и значительному увеличению глутатионпероксидазной активности крови подопытных крыс. При этом супероксиддисмугазная активность существенно не изменялась, а содержание ферментативно-активного церулоплазмينا снижалось к 13 и 17 суткам эксперимента и затем существенно возросло (на 62 %) к 31 суткам. Анализируя полученные данные об изменении супероксиддисмугазной активности и содержании церулоплазмينا можно заключить, что на относительно ранних сроках введения ММИ (на 13 и 17 сутки) в защите ткани крови от супероксидных радикалов значительную роль играет супероксиддисмугаза, а на более поздних – церулоплазмин.

Введение на фоне ММИ АДС-анатоксина не оказывало существенного влияния на динамику изменения концентрации гидроперекисей липидов и не изменяло супероксиддисмугазную активность крови подопытных животных. Вместе с тем, уровни глутатионпероксидазной активности и содержания ферментативно-активного церулоплазмينا в крови иммунизированных животных несколько снижались. Это объясняется, касательно глутатионпероксидазы,

увеличением концентрации тиреоидных гормонов, а относительно церулоплазмينا – уровнями белка крови экспериментальных животных на начальной стадии формирования специфического иммунного ответа на АДС-анатоксин [3, 4]. Установленные особенности свидетельствуют о возможности использования показателей состояния прооксидантно-антиоксидантной системы крови в качестве биохимических маркеров для разработки надёжных критериев оценки эффективности иммунизации.

Выводы

- 1-метил-2-меркаптоимидазол в дозе 1 мг на 100 г массы тела при внутрижелудочном введении животным в течение 38 суток приводит к смещению прооксидантно-антиоксидантного баланса крови в сторону антиоксидантов.
- В процессе формирования иммунного ответа на введение дифтерийного и столбнячного анатоксинов в составе АДС-вакцины в сыворотке крови гипотиреоидных крыс существенно ингибировалась активность глутатионпероксидазы и содержание ферментативно-активного церулоплазмينا.

Литература

1. Садовникова И.П. Влияние геропротекторов-антиоксидантов на иммунные реакции // «Итоги науки и техники ВИНТИ. Общие проблемы биологии». – 1986. – № 5. – С. 69 – 109.
2. Барабой В.А., Сутовой Д.А. Окислительно-антиоксидантный гомеостаз в норме и патологии. – Киев: Наукова думка, 1997. – 420 с.
3. Волянский А.Ю., Никитченко Ю.В., Симиренко Л.Л., Ищенко Т.І., Кучма І.Ю. Супероксиддисмугазная активність та вміст ферментативно-активного церулоплазмину сироватки крові щурів різного віку за

умов імунізації АДП-анатоксином // Аналі Мечніківського інституту. – 2007. – № 2. – С.34-36 (www.imiamn.org/journ)

4. Волянський А.Ю., Смиренко 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. – Р. 159 – 164.

5. Волянский А.Ю., Никитченко Ю.В., Смиренко Л.Л., Кучма И.Ю. Влияние переедания в постнатальном периоде на состояние прооксидантно-антиоксидантной системы крови крыс при иммунизации АДС-анатоксином // Аналі Мечніківського інституту. – 2007. – № 4. – С.3-5 (www.imiamn.org/journ)

6. Волянский А.Ю., Никитченко Ю.В., Смиренко Л.Л., Кучма И.Ю., Ищенко Т.И. Влияние калорийно ограниченной диеты на активность прооксидантно-антиоксидантной системы крови щуров за условий иммунизации АДП-анатоксином // Буковинський медичний вісник. – 2007. – Т. 11, № 3. – С. 115 – 118.

7. Никитченко Ю.В., Падалко В.И., Белостоцкая Л.И., Дзюба В.Н., Бондарь В.В., Золотухина А.А., Козлова Е.В. Мембранные окислительные процессы при моделировании ускоренного старения длительным воздействием тироксина // Пробл. старения и долголетия. – 2005. – Т. 14, приложение (Тези IV нац. конгр. геронтологів і геріатрів України, Київ, 11 – 13 жовтня 2005 р.). – С. 40.

8. Воронина Л.Н., Кравченко В.Н., Никитченко Ю.В., Шоно Н.А., Кравченко А.Б. Состояние перекисного окисления липидов в печени крыс при введении тетраксона и мерказолила // Труды науч. конф. "Научное наследие академика И.Н. Буланкина и его развитие в современной биохимии", 16 - 17 января 2001, г. Харьков. - Харьков, 2001. - С. 31 - 33.

9. Волянський А.Ю., Смиренко Л.Л., Кучма І.Ю., Никитченко Ю.В., Крестецька С.Л. Моделювання процесу специфічного антитілогенезу за умов імунізації щурів АДП-анатоксином // Інфекційні хвороби. - 2006. - № 4. - С. 62-66.

10. Asakawa T., Matsushita S. Coloring condition of thiobarbituric acid test for detecting lipid hydroperoxides // Lipids. – 1980. – V. 15, N 3. – Р. 137 – 140.

11. Ланкин В.З., Гуревич С.М. Ингибирование перекисления липидов и детоксикация липоперекисей защитными ферментными системами (супероксиддисмутаза, глутатион-пероксидаза и глутатион-редуктаза) при экспериментальном злокачественном росте // Докл. АН СССР. – 1976. – Т. 226, N 3. – С. 705 – 708.

12. Beavchamp C., Fridovich I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels // Anal. Biochem. – 1971. – V. 44, N 1. – Р. 276–287.

13. Ravin H.A. Rapid test for hepatolenticular degeneration // Lancet. – 1956. – V. 1. – Р. 7267 – 7271.

14. Нікітченко Ю.В., Дзюба В.М., Бондар В.В. Роль тиреоїдних гормонів у регуляції активності антиоксидантних ферментів за старіння щурів // Укр. біохім. журн. - 2002. - Т. 74, N 4а (додаток 1, Спец.

випуск. Матер. VIII Укр. біохім. з'їзду, 1 - 3 жовтня 2002 р., м. Чернівці). - С. 64.

УДК 61:612.017:615.371

ВЛИЯНИЕ 1-МЕТИЛ-2-МЕРКАПТОИМИДАЗОЛА НА СОСТОЯНИЕ ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ КРОВИ КРЫС ПРИ ИММУНИЗАЦИИ АДС-АНАТОКСИНОМ

Волянский А. Ю., Кучма И.Ю., Никитченко Ю.В., Смиренко Л.Л.

Исследована динамика изменения содержания гидроперекисей липидов, концентрации ферментативно-активного церулоплазмينا, супероксиддисмутазной и глутатионпероксидазной активностей в сыворотке крови 3-месячных крыс при длительном введении 1-метил-2-меркаптоимидазола (мерказолила) и в процессе формирования на этом фоне иммунного ответа к дифтерийному и столбнячному анатоксинам – составляющим АДС-вакцины. Обнаружено, что исследуемый антидифтерийный препарат смещал прооксидантно-антиоксидантный баланс крови в сторону антиоксидантов. Введение на фоне мерказолила АДС-анатоксина приводило к замедлению изменений активности глутатионпероксидазы и содержания ферментативно-активного церулоплазмينا.

Ключевые слова: прооксидантно-антиоксидантный баланс, 1-метил-2-меркаптоимидазол, АДС-анатоксин, крысы.

УДК 61:612.017:615.371

ВПЛИВ 1-МЕТИЛ-2-МЕРКАПТОІМІДАЗОЛУ НА СТАН ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ КРОВІ ЩУРІВ ЗА УМОВ ІМУНІЗАЦІЇ АДП-АНАТОКСИНОМ

Волянський А.Ю., Кучма І.Ю., Нікітченко Ю.В., Смиренко Л.Л.

Досліджено динаміку змін вмісту гідроперекисів ліпідів, концентрації ферментативно-активного церулоплазмину, супероксиддисмутазної та глутатионпероксидазної активностей у сироватці крові 3-місячних щурів за умов тривалого введення 1-метил-2-меркаптоїмідазолу (мерказолілу) і в процесі формування на цьому тлі імунної відповіді до дифтерійного та правцевого анатоксинів – складових АДП-вакцини. Виявлено, що досліджений антидифтерійний препарат зміщував прооксидантно-антиоксидантний баланс крові у бік антиоксидантів. Введення на тлі мерказолілу АДП-анатоксину приводило до уповільнення змін активності глутатионпероксидази та вмісту ферментативно-активного церулоплазмину.

Ключові слова: прооксидантно-антиоксидантний баланс, 1-метил-2-меркаптоїмідазол, АДП-анатоксин, щури.

THE EFFECT OF 1-METHYL-2-MERCAPTOIMIDAZOL INFLUENCE ON THE

**PROOXIDANT-ANTIOXIDANT SYSTEM IN
RAT'S BLOOD AFTER ADT-IMMUNIZATION**

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

The dynamics of lipid hydroperoxide concentration changes, enzymatically active ceruloplasmin concentration, superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities in blood serum of 3-monthly old rats under long-term administration of 1-methyl-2-mercaptoimidazol (mercazolil) and in the process of immunity response formation against diphtheria and tetanus anatoxins of ADT-vaccine was studied. The investigated antithyroid remedy was revealed to displace the prooxidant-antioxidant balance of blood to the side of antioxidants. The administration of ADT-vaccine against the background of mercazolil had resulted in the slowing of changes of glutathione peroxidase activity and enzymatically active ceruloplasmin content.

Key words: prooxidant-antioxidant balance, 1-methyl-2-mercaptoimidazol, ADT-anatoxin, rats.