

УДК 61:612.017:615.371

**ВЛИЯНИЕ ПИЩЕВОЙ НАГРУЗКИ В  
ПОСТНАТАЛЬНОМ ПЕРИОДЕ НА  
СОСТОЯНИЕ  
ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНОЙ  
СИСТЕМЫ КРОВИ КРЫС ПРИ  
ИММУНИЗАЦИИ  
АДС-АНАТОКСИНОМ**

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

**ГП «Институт микробиологии и иммунологии им.  
И.И. Мечникова АМН**

Известно, что иммуногормональный статус организма в значительной степени определяется состоянием его прооксидантно-антиоксидантной системы [1, 2]. Нами ранее показано, что изменение процесса формирования антиоксидантного иммунного ответа на дифтерийный и столбнячный анатоксин в составе АДС-вакцины тесно связаны с изменением прооксидантно-антиоксидантного баланса и тиреоидного статуса крыс [3 – 5]. В частности, установлено, что калорийно-ограниченная диета, приводящая к снижению уровней тиреоидных гормонов в крови подопытных животных, значительно увеличивает активность ряда антиоксидантных ферментов и снижает содержание продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) [3, 6]. С другой стороны, установлено, что введение относительно больших доз тироксина подопытным крысам индуцирует ПОЛ и снижает активность антиоксидантной системы [7, 8]. Влияние относительно малых, соизмеримых с физиологическими, концентраций тиреоидных гормонов на состояние прооксидантно-антиоксидантной системы крови при иммунизации АДС-анатоксином не изучено.

В литературе имеются данные, свидетельствующие о том, что переедание в раннем постнатальном периоде у крыс приводит к достоверному увеличению концентрации тироксина на фоне низкого уровня включения меченого йода в щитовидную железу [9, 10]. Такое изменение тиреоидного статуса сопровождалось увеличением массы тела эпидидимального жира, показателей липидного обмена (общий холестерин, триглицериды, апо-В-липопротеиды) крови и снижением активности протеаз лизосом печени в течение всей жизни подопытных животных и объяснялось импринтингом, генетическим запоминанием действия переедания на определенном этапе формирования геной регуляции [10].

Цель работы - исследование влияния повышенного уровня тироксина вследствие переедания в раннем постнатальном периоде на состояние прооксидантно-антиоксидантной системы организма при иммунизации АДС-анатоксином.

**Материалы и методы**

Исследование влияния переедания в раннем постнатальном периоде на состояние прооксидантно-антиоксидантной системы крови в процессе формирования иммунного ответа к дифтерийному и столбнячному анатоксином АДС-вакцины проводили на 3-

месячных крысах-самцах линии Вистар. Переедание в раннем постнатальном периоде у крыс моделировали путем уменьшения числа новорожденных крысят до двух особей в гнезде на одну кормящую самку [10]. В контрольную группу входили животные, выращенные в гнездах по 8 – 10 особей на одну кормящую самку. В 1-месячном возрасте животных контрольных и подопытных групп переводили на стандартный рацион питания вивария и выращивали до 3-месячного возраста. В эксперимент взято 4 группы крыс: 1 и 2 группы – животные до иммунизации, контрольная и подопытные группы соответственно; 3 и 4 группы – животные после иммунизации АДС-анатоксином (на 3, 7, 14 и 21 сутки), контрольные и подопытные группы соответственно. АДС-вакцину вводили подкожно, однократно в дозе 15 ЛФ дифтерийного и 5 ЕС столбнячного анатоксинов в 0,25 мл препарата. Эту дозу как минимально эффективную определили в предварительном исследовании при разработке модели иммунного ответа на АДС-анатоксин [11]. 1 и 2 группы экспериментальных животных включали в себя по шесть особей, а 3 и 4 – по двенадцать. Кровь для анализов отбирали путем декапитации, получали сыворотку и хранили при пониженной температуре до использования в опыте.

Измерение концентрации гидроперекисей липидов проводили по методу Asakawa et al. [12]. Спектр поглощения окрашенного продукта регистрировали на двулучевом спектрофотометре Specord UV VIS, разницу экстинкций измеряли при 535 и 520 нм. Содержание гидроперекисей липидов рассчитывали в эквивалентных количествах малонового диальдегида соответственно коэффициенту молярной экстинкции  $1,56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

Глутатионпероксидазную активность (КФ 1.11.1.9) определяли в 50 мМ  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ -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 [13]. Реакцию проводили при температуре 37°C и постоянном перемешивании. Глутатионпероксидазную активность регистрировали при 340 нм на двулучевом спектрофотометре Specord UV VIS (Германия). Активность выражали в мкмоль NADPH/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 следующим образом. Метод [14] 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  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ -фосфатный буфер (рН 7,8), 50 мМ  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 0,1 мМ ЭДТА, 25 мкМ нитротетразолий синий, 0,1 мМ ксантин, 0,003 ед. ксантинооксидазы. За единицу супероксиддисмутазной активности принимали 50%-ное ингибирование скорости восстановления нитротетразолия синего при температуре 37°C. Супероксиддисмутазную активность регистрировали при 560 нм на двулучевом спектрофотометре Specord UV VIS (Германия) и рассчитывали.

тывали в единицах активности на 1 мл сыворотки крови.

Содержание ферментативно-активного церулоплазмينا (КФ 1.16.3.1) определяли в среде, содержащей 0,1 М ацетатный буфер (рН 5,5) и 0,1 % парафенилендиамин [15]. Сыворотку крови добавляли в количестве 0,02 мл на 2 мл реакционной среды. Длительность инкубации – 1 час при температуре 37°C. Реакцию останавливали добавлением 0,01%-ного азида натрия. Оптическую плотность окрашенных образцов регистрировали на дуолучевом спектрофотометре Specord UV VIS (Германия) при 530 нм, содержание церулоплазмينا выражали в мг на 100 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

Проведенные исследования влияния переизбытка в постнатальном онтогенезе на состояние прооксидантно-антиоксидантной системы крови 3-месячных крыс позволило установить, что активность супероксиддисмутазы – фермента, утилизирующего супероксидные радикалы, и содержание второго белка, эффективно участвующего в этом процессе, – церулоплазмينا в сыворотке крови подопытных животных существенно не отличалось от значений контрольной группы животных (табл. 1).

Не обнаружено достоверных изменений в сыворотке крови подопытных животных и содержания гидроперекисей липидов (табл. 2). В то же время активность фермента, утилизирующего эти продукты ПОЛ, – селензависимой глутатионпероксидазы в ответ на переизбыток в раннем постнатальном периоде достоверно снижалась (табл. 2).

**Таблица 1. Влияние переизбытка в постнатальном периоде на супероксиддисмутазу и содержание ферментативно-активного церулоплазмينا в сыворотке крови крыс при иммунизации АДС-анатоксином ( $M \pm m$ ).**

Время, сутки		Супероксиддисмутазы, усл.ед/мл сыворотки		Церулоплазмин, мг/100 мл сыворотки	
		контроль	опыт	контроль	опыт
до иммунизации		223,6 ± 27,3	201,6 ± 16,5	19,7 ± 2,1	22,0 ± 1,8
после иммунизации	3	189,0 ± 12,0	175,9 ± 16,0	24,0 ± 4,5	29,5 ± 2,5**
	7	173,4 ± 7,7	168,6 ± 6,2	28,2 ± 2,5**	36,5 ± 2,1***
	14	156,5 ± 36,1	177,9 ± 41,0	30,9 ± 1,5**	26,8 ± 0,8**
	21	191,8 ± 10,3	189,9 ± 16,5	22,6 ± 1,6	24,3 ± 2,0

Примечания: \* –  $P < 0,05$  по сравнению с соответствующим контролем;

\*\* –  $P < 0,05$  по сравнению со значениями до иммунизации.

Проведенные ранее нами исследования активности Se-зависимой глутатионпероксидазы при длительном введении тироксина и калорийно-ограниченной диете свидетельствуют об участии тиреоидных гормонов в регуляции активности данного фермента [3, 6, 8, 16]. Так, в частности, при калорийно-ограниченной диете, которая приводила к значительному снижению уровня тиреоидных гормонов в сыворотке крови подопытных крыс [3, 17], активность

Se-зависимой глутатионпероксидазы увеличивалась [3, 16], а при 2-месячном введении тироксина – снижалась [8]. В связи с вышеизложенным, не исключено, что обнаруженное нами снижение Se-зависимой глутатионпероксидазной активности у подопытных животных связано с тем фактом, что переизбыток в постнатальном периоде приводит к увеличению концентрации тироксина в сыворотке [9, 10].

**Таблица 2. Влияние переизбытка в постнатальном периоде на содержание гидроперекисей липидов и глутатионпероксидазную активность в сыворотке крови крыс при иммунизации АДС-анатоксином ( $M \pm m$ ).**

Время, сутки		Гидроперекиси липидов, нмоль МДА/мл сыворотки		Глутатионпероксидаза, мкмоль NADPH/мин·мл сыворотки	
		контроль	опыт	контроль	Опыт
до иммунизации		2,62 ± 0,07	2,86 ± 0,10	1,54 ± 0,11	1,17 ± 0,12*
после иммунизации	3	2,72 ± 0,17	2,88 ± 0,37	1,13 ± 0,21	1,40 ± 0,01
	7	2,84 ± 0,24	2,64 ± 0,14	1,04 ± 0,22	1,00 ± 0,12**
	14	2,76 ± 0,12	2,76 ± 0,07	1,33 ± 0,22	1,14 ± 0,09
	21	2,80 ± 0,08	2,50 ± 0,20	1,53 ± 0,13	1,43 ± 0,25

Примечания: \* –  $P < 0,05$  по сравнению с соответствующим контролем;

\*\* –  $P < 0,05$  по сравнению со значениями через 3 суток после

#### введения АДС-анатоксина.

Исследование особенностей изменений состояния прооксидантно-антиоксидантной системы крови контрольных и подопытных животных в процессе формирования иммунного ответа на дифтерийный и столбнячный анатоксины в составе АДС-анатоксина позволило установить, что через 3, 14 и 21 сутки после иммунизации содержание гидроперекисей липидов и активность супероксиддисмутазы в сыворотке крови обеих групп животных существенно не изменялись (табл. 1, 2).

В то же время, активность Se-зависимой глутатионпероксидазы несколько увеличивалась к 3 суткам после введения АДС-анатоксина ( $0,05 < P < 0,1$ ) и затем достоверно снижалась к 7 суткам эксперимента (табл. 1). У контрольных животных активность исследуемого фермента несколько снижалась к 7 суткам после введения АДС-анатоксина ( $0,05 < P < 0,1$ ). В дальнейшем, через 14 и 21 сутки эксперимента, активность Se-зависимой глутатионпероксидазы у контрольных и подопытных крыс достоверно не отличалась от значений активности у животных до иммунизации. Содержание ферментативно-активного церулоплазмينا в крови контрольных и подопытных животных в процессе формирования иммунного ответа на АДС-анатоксин значительно увеличивалось в период от 3 до 14 суток эксперимента и затем к 21 суткам снижалось до уровня значений, характерных животным до иммунизации (табл. 2). При этом у подопытных животных достоверное увеличение содержания ферментативно-активного церулоплазмينا наблюдалось уже через 3 суток после введения АДС-анатоксина, а у контрольных крыс – только через 7 суток эксперимента. Следует также отметить, что по абсолютным значениям концентрация ферментативно-активного церулоплазмينا в сыворотке крови подопытных животных на 7 сутки после введения АДС-вакцины была достоверно выше, чем у соответствующей группы контрольных крыс.

Проведенные ранее нами исследования содержания ферментативно-активного церулоплазмينا в сыворотке крови молодых и старых крыс в процессе формирования иммунного ответа на дифтерийный и столбнячный анатоксин в составе АДС-вакцины свидетельствуют о тесной взаимосвязи изменений концентрации церулоплазмينا, уровня специфического антителогенеза и скорости процесса формирования антиоксидантного иммунного ответа на АДС-анатоксин [4, 5]. В связи с вышеизложенным и полученными в настоящей работе данными об особенностях влияния перекармливания в постнатальном периоде на содержание ферментативно-активного церулоплазмينا при иммунизации АДС-анатоксином, представляется целесообразным изучение взаимосвязи этого показателя антиоксидантной системы крови с антителогенезом с целью разработки дополнительных тестов оценки эффективности иммунизации.

#### Выводы

1. Установлено, что перекармливание в раннем постнатальном периоде приводит к снижению надежно-

сти ферментативной антиоксидантной системы крови трехмесячных крыс, обусловленной, в основном, снижением селензависимой глутатионпероксидазной активности.

2. Содержание ферментативно-активного церулоплазмينا в сыворотке крови трехмесячных подопытных крыс увеличивалось на более ранних сроках формирования иммунного ответа, чем у контрольных животных.

#### Список литературы

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., Сутковой Д.А. Окислительно-антиоксидантный гомеостаз в норме и патологии. – Киев: Наукова думка, 1997. – 420 с.
3. Волянський А.Ю., Никитченко Ю.В., Симиренко Л.Л., Іщенко Т.І., Кучма І.Ю. Супероксиддисмутазна активність та вміст ферментативно-активного церулоплазмину сироватки крові щурів різного віку за умов імунізації АДП-анатоксином // Аналі Мечниківського інституту. – 2007. – № 2. – Web: <http://www.imiamn.org/journal.htm>
4. 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. – Р. 159 – 164.
5. Волянський А.Ю., Никитченко Ю.В., Симиренко Л.Л., Іщенко Т.І., Кучма І.Ю., Крестецькая С.Л. Супероксиддисмутазна активність та вміст ферментативно-активного церулоплазмину сироватки крові щурів різного віку за умов імунізації АДП-анатоксином // Аналі Мечниківського інституту. – 2007. – № 2. – Web: <http://www.imiamn.org/journal.htm>
6. Никитченко Ю.В. Влияние калорийно-ограниченной диеты на ферментативную и неферментативную антиоксидантные системы эритроцитов и плазмы крови крыс разного возраста // Биологический вестник. – 1998. – Т. 2, N 2. – С. 16 – 19.
7. Лемешко В.В., Никитченко Ю.В., Калиман П.А. Активация перекисного окисления липидов мембран в печени молодых и старых крыс тироксином и актиномицином Д // Укр. биохим. журн. – 1983. – Т. 55, N 2. – С. 206 – 209.
8. 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 тироксином // Пробл. старения и долголетия. – 2005. – Т. 14, приложение (Тези IV нац. конгр. геронтологів і геріатрів України, Київ, 11 – 13 жовтня 2005 р.). – С. 40.
9. Aust L., Hartmann K., Weber A. et al. The influence of early postnatal overnutrition on peripheral thyroxine metabolism in rats // Exp. Clin. Endocrinol. – 1986. – V. 87, N 3. – P. 299 – 305.

10. Фролькис В.В., Григоров Ю.Г., Писарчук К.Л., Медовар Б.Я. Влияние переедания в постнатальном периоде на старение и продолжительность жизни крыс // Пробл. старения и долголетия. – 1992. – Т. 2, № 4. – С. 339 – 347.
11. Волянський А.Ю., Симиренко 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.
12. Asakawa T., Matsushita S. Coloring condition of thiobarbituric acid test for detecting lipid hydroperoxides // Lipids. – 1980. – V. 15, N 3. – P. 137 – 140.
13. Ланкин В.З., Гуревич С.М. Ингибирование перекисления липидов и детоксикация липоперекисей защитными ферментными системами (супероксиддисмутаза, глутатион-пероксидаза и глутатионредуктаза) при экспериментальном злокачественном росте // Докл. АН СССР. – 1976. – Т. 226, N 3. – С. 705 – 708.
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. Ravin H.A. Rapid test for hepatolenticular degeneration // Lancet. – 1956. – V. 1. – P. 7267 – 7271.
16. 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.
17. Никитин В.Н. Подходы к экспериментальному продлению жизни // Физиол. журн. – 1990. – Т. 36, № 5. – С. 11 – 16.

УДК 61:612.017:615.371

**ВЛИЯНИЕ ПИЩЕВОЙ НАГРУЗКИ В ПОСТНАТАЛЬНОМ ПЕРИОДЕ НА СОСТОЯНИЕ ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ КРОВИ КРЫС ПРИ ИММУНИЗАЦИИ АДС-АНАТОКСИНОМ**

**Волянский А.Ю., Никитченко Ю.В., Симиренко Л.Л., Кучма И.Ю., Давыденко М.Б.**

На крысах линии Вистар исследовано влияние переедания в раннем постнатальном периоде на состояние прооксидантно-антиоксидантной системы крови при иммунизации АДС-вакциной. Обнаружено снижение надежности ферментативной антиоксидантной системы крови подопытных животных, обусловленное уменьшением селензависимой глутатионпероксидазной активности. Показано, что в процессе формирования иммунного ответа к дифтерийному и столбнячному анатоксинам в составе АДС-вакцины содержание ферментативно-активного церулоплазмину у подопытных крыс увеличивалось на более ранних сроках, чем у контрольных животных.

**Ключевые слова:** прооксидантно-антиоксидантный баланс, АДС-анатоксин, крысы, переедание.

УДК 61:612.017:615.371

**ВПЛИВ ХАРЧОВОГО НАВАНТАЖЕННЯ В ПОСТНАТАЛЬНОМУ ПЕРІОДІ НА СТАН ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ КРОВІ ЩУРІВ ЗА УМОВ ІМУНІЗАЦІЇ АДП-АНАТОКСИНОМ**

**Волянський А.Ю., Нікітченко Ю.В., Симиренко Л.Л., Кучма І.Ю., Давиденко М.Б.**

**Волянський А.Ю., Нікітченко Ю.В., Симиренко Л.Л., Кучма І.Ю., Давиденко М.Б.**

На щурах лінії Вістар досліджено вплив переїдання в ранньому постнатальному періоді на стан прооксидантно-антиоксидантної системи крові за умов імунізації АДП-вакциною. Виявлено зниження надійності ферментативної антиоксидантної системи крові піддослідних тварин, яке обумовлено зменшенням селензалежної глутатионпероксидазної активності. Показано, що в процесі формування імунної відповіді до дифтерійного та правцевого анатоксинів у складі АДП-вакцини вміст ферментативно-активного церулоплазмину у піддослідних щурів зростало на більш ранніх строках, ніж у контрольних тварин.

**Ключові слова:** прооксидантно-антиоксидантний баланс, АДП-анатоксин, щури, переїдання.

УДК 61:612.017:615.371

**THE INFLUENCE OF ALIMENTARY LOAD IN POSTNATAL PERIOD ON THE STATE OF PROOXIDANT-ANTIOXIDANT SYSTEM OF RAT BLOOD UNDER IMMUNIZATION BY ADT-ANATOXIN**

**Volyansky A.Yu., Nikitchenko J.V., Simirenko L.L., Kuchma I.Yu., Davidenko M. B.**

The influence of overnutrition in early postnatal period on the state of prooxidant-antioxidant system of blood under immunization of Wistar rats by ADT-anatoxin was investigated. The lowering of reliability of enzymatic antioxidant system conditioned by the decrease of selenium-dependent glutathione peroxidase activity was revealed in blood of experimental animals. It was shown that in the process of formation of immune response to diphtheria and tetanus anatoxins of ADT-vaccine the content of enzymatically active ceruloplasmin in experimental rats was increased at more early stages compared with control rats.

**Key words:** prooxidant-antioxidant balance, ADT-anatoksin, rats, overnutrition.