

УДК 61:612.017:615.371

## ВЛИЯНИЕ НЕСБАЛАНСИРОВАННОЙ ДИЕТЫ НА СОСТОЯНИЕ ПРООКСИДАНТНО- АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ КРОВИ КРЫС ПРИ ИММУНИЗАЦИИ АДС- АНАТОКСИНОМ

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

ГУ "Институт микробиологии и иммунологии  
им. И.И. Мечникова  
АМН Украины", г. Харьков

Многочисленные исследования свидетельствуют, что иммуногормональный статус в значительной степени определяется состоянием прооксидантно-антиоксидантной системы [1-4]. Нами показано, что изменение процесса специфического антителогенеза к дифтерийному и столбнячному анатоксину в составе АДС-вакцины тесно связано с изменением антиоксидантной системы и тиреоидного статуса организма крыс [3, 5]. В частности, при калорийно-ограниченной, продляющей жизнь животных диете, при сниженном уровне тиреоидных гормонов и повышенной активности антиоксидантных ферментов в сыворотке крови дифтерийные антитоксины, в ответ на введение АДС-анатоксина, появлялись в крови значительно раньше, чем у животных контрольных групп [4, 5].

Отличие от калорийно-ограниченной диеты действие двухмесячного несбалансированного по содержанию животных белков и витаминов антиоксидантного ряда питания приводило к повышению концентрации тироксина в сыворотке крови и значительному снижению активности антиоксидантных ферментов [6 - 8]. Учитывая, что фактический рацион питания значительной части населения является "несбалансированным" [9], цель настоящей работы заключалась в исследовании особенностей изменения прооксидантно-антиоксидантного баланса крови при иммунизации АДС-анатоксином в зависимости от степени сбалансированности питания животных по необходимым пищевым компонентам.

### Материалы и методы

Исследование влияния несбалансированной диеты на состояние прооксидантно-антиоксидантного баланса крови в процессе формирования иммунного ответа к дифтерийному и столбнячному анатоксинам в составе АДС-вакцины были проведены на 3-месячных крысах-самцах линии Wistar, содержащихся в стандартных условиях вивария, при этом были соблюдены правила Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и научных целей (Страсбург, 1986 г).

Недостаточность рациона по содержанию животных белков и витаминов антиоксидантного ряда моделировали у 1-месячных животных исключением

из диеты в течение 60 суток мяса, термической обработкой подсолнечного масла (+ 180 °С в течение 3 часов для полного разрушения витамина Е) и зерновой смеси с овощами (+ 100 °С в течение 1 часа). Мясную добавку в рационе подопытных крыс заменяли эквивалентной по массе термически обработанной зерновой смесью. Проведенный совместно с сотрудниками лаборатории оценки качества кормов и продуктов животного происхождения института животноводства УААН сравнительный анализ стандартного и несбалансированного рационов позволил установить, что несбалансированный рацион характеризовался снижением содержания жира (на 26,0%), протеина (на 35,7%), витамина Е (на 36,8%) и ряда незаменимых аминокислот.

В эксперимент было взято 4 группы крыс: 1 и 2 группы – животные до иммунизации, контрольная и подопытная группы соответственно; 3 и 4 группы – крысы после иммунизации АДС-анатоксином (на 3, 7, 14, 21 и 28 сутки), контрольная и подопытная группы соответственно. АДС-вакцину вводили подкожно, однократно в дозе 15 LF дифтерийного и 5 ЕС столбнячного анатоксинов в 0,25 мл препарата. Эта доза, как минимально эффективная, была выбрана в предварительном исследовании при разработке модели иммунного ответа на АДС-анатоксин [10]. 1 и 2 группы экспериментальных животных включали в себя по 5 особей, а 3 и 4 группы – по 15 животных. Кровь для анализов отбирали путем декапитации, получали сыворотку и хранили на холоду до использования в опыте.

Измерение концентрации гидроперекисей липидов проводили по методу Asakawa et al. [11]. 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 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, 0,15 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 [12]. 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 [13]. Метод состоит в определении степени ингибирования реакции восстановления нитротетразолия синего супероксидными радикалами, которые генерируются с определенной скоростью в ксантин-ксантинооксидазной системе. Супероксиддисмутаз-

ную активность измеряли в среде, содержащей 50 мМ К<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>-фосфатный буфер (рН 7,8), 50 мМ Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 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° С. Супероксиддисмутазную активность регистрировали при 560 нм на двулучевом 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, как описано в работе [14], в среде, 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 исследования и их обсуждение

Проведенные исследования влияния несбалансированного питания на состояние прооксидантно-антиоксидантного баланса в крови 3-месячных крыс позволило установить, что содержание гидроперекисей липидов в сыворотке крови подопытных животных увеличивалось, а активность фермента, утилизирующего эти продукты свободнорадикального окисления липидов – селензависимой глутатионпероксидазы, снижалась (табл. 1).

Активность супероксиддисмутазы (СОД) – фермента, утилизирующего супероксидные радикалы, достоверно снижалась, а содержание второго белка, эффективно участвующего в этом процессе – церулоплазмينا, в сыворотке крови подопытных

животных существенно не отличалось от значений контрольной группы животных (табл. 2).

При этом следует отметить, что соотношение активности супероксиддисмутазы к содержанию церулоплазмينا в сыворотке крови крыс, которое считают надежным показателем состояния первого уровня ферментативной антиоксидантной защиты организма при развитии ряда патологий [15], в ответ на несбалансированную диету существенно снижалось. Так, если у контрольных крыс соотношение СОД / церулоплазмин составляло 249,5 ± 17, то у подопытных животных только 177,9 ± 6,7 (n=5, P < 0,05). Таким образом, проведенные исследования свидетельствуют, что несбалансированная по содержанию животных белков и витаминов антиоксидантного ряда диета приводит к активации перекисного окисления липидов и снижению активности антиоксидантных ферментов и, в значительной степени, селензависимой глутатионпероксидазы. Следует отметить, что продукты ПОЛ, концентрация которых в ответ на несбалансированную диету возрастала в печени [7] и крови (табл. 1), также могут приводить к окислению селена, замедлять его включение в активный центр глутатионпероксидазы и ускорять деградацию этого фермента [16].

С другой стороны, ранее проведенные нами исследования активности селензависимой глутатионпероксидазы при введении тироксина, антитиреоидного препарата мерказолила и при действии калорийно-ограниченной диеты и избыточного питания в раннем постнатальном онтогенезе крыс свидетельствует об участии тиреоидных гормонов в регуляции активности данного фермента [4, 17, 18]. Так, в частности, при калорийно-ограниченной диете, которая приводила к значительному снижению уровня тиреоидных гормонов в сыворотке крови подопытных крыс, и при введении мерказолила активность селензависимой глутатионпероксидазы увеличивалась [4, 18], а при введении тироксина и избыточном питании в раннем постнатальном онтогенезе крыс, результатом чего было повышение содержания тироксина в сыворотке крови, – снижалась [17].

**Таблица 1. Влияние несбалансированного питания на содержание гидроперекисей липидов и глутатионпероксидазную активность в сыворотке крови крыс при иммунизации АДС-анатоксином (M ± m)**

Варианты опытов		Гидроперекиси липидов, нмоль МДА/мл		Глутатионпероксидаза, мкмоль NADPH/мин·мл	
		Контроль	Опыт	Контроль	Опыт
До иммунизации		2,67 ± 0,22	3,27 ± 0,13*	1,22 ± 0,19	0,77 ± 0,05*
После иммунизации, сутки	3	2,98 ± 0,04	2,93 ± 0,20	1,03 ± 0,15	0,72 ± 0,14
	7	2,63 ± 0,08	2,93 ± 0,20	1,09 ± 0,35	1,09 ± 0,09**
	14	2,73 ± 0,46	3,06 ± 0,08	1,42 ± 0,20	0,95 ± 0,13*
	21	2,76 ± 0,21	2,98 ± 0,15	1,33 ± 0,32	0,96 ± 0,05**
	28	2,59 ± 0,04	2,80 ± 0,15	1,32 ± 0,12	0,82 ± 0,22

Примечания: \* – P < 0,05 по сравнению с соответствующим контролем; \*\* – P < 0,05 по сравнению со значением до иммунизации.

**Таблица 2. Влияние несбалансированного питания на супероксиддисмутазную активность и содержание ферментативно-активного церулоплазмينا в сыворотке крови крыс при иммунизации АДС-анатоксином ( $M \pm m$ )**

Варианты опытов		СОД,		Церулоплазмин,	
		усл. ед. /мл сыворотки		нмоль/мл сыворотки	
		Контроль	Опыт	Контроль	Опыт
До иммунизации		268,3 ± 20,5	204,2 ± 15,1*	1,11 ± 0,16	1,15 ± 0,08
После иммунизации, сутки	3	246,2 ± 20,7	207,6 ± 18,1	1,72 ± 0,21**	1,68 ± 0,06**
	7	281,4 ± 18,9	256,6 ± 23,3	2,14 ± 0,27**	2,03 ± 0,38**
	14	258,0 ± 15,9	208,0 ± 17,3	1,69 ± 0,15**	1,39 ± 0,11
	21	236,8 ± 20,2	207,2 ± 23,7	1,47 ± 0,16	1,35 ± 0,04
	28	264,4 ± 22,4	224,0 ± 23,9	1,19 ± 0,08	1,03 ± 0,14

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

При этом обнаруженное снижение глутатионпероксидазной активности может быть связано и со снижением концентрации селена в организме [16].

Снижение концентрации селена при белково-недостаточной диете авторы работы [16] объясняют уменьшением количества транспортных белков сыворотки крови и ускорением выведения селена из организма.

В связи с вышеизложенным, не исключено, что обнаруженное нами снижение активности селензависимой глутатионпероксидазы у подопытных животных связано с тем, что несбалансированная диета приводит к увеличению концентрации тироксина в сыворотке крови [8].

Исследование особенностей изменений состояния прооксидантно-антиоксидантной системы крови контрольных и подопытных крыс в процессе формирования иммунного ответа на дифтерийный и столбнячный анатоксины в составе АДС-анатоксина позволило установить, что через 3, 14, 21 и 28 суток после иммунизации содержание гидроперекисей липидов и активности супероксиддисмутазы в сыворотке крови обеих групп животных достоверно не изменялись (табл. 1, 2).

В то же время, активность селензависимой глутатионпероксидазы в сыворотке крови подопытных животных достоверно увеличивалась к 7 суткам после введения АДС-анатоксина, далее, до 21 суток, оставалась практически на том же уровне, а к 28 суткам снижалась до уровня активности, характерной для неиммунизированных животных (табл. 1).

У животных контрольной группы активность исследуемого фермента через 3, 7, 14, 21 и 28 суток после иммунизации существенно не изменялась. Содержание ферментативно-активного церулоплазмينا в сыворотке крови животных контрольной и подопытной групп в процессе формирования иммунного ответа на АДС-анатоксин значительно увеличивалось к 3 и 7 суткам эксперимента, и в дальнейшем снижалось до уровня значений, характерных для животных до иммунизации (табл. 2). При этом у подопытных животных достоверное снижение со-

держания ферментативно-активного церулоплазмينا наблюдалось уже к 14 суткам после введения АДС-анатоксина, а у контрольных крыс - только к 21 суткам эксперимента.

Полученные данные свидетельствуют о том, что несбалансированное по животным белкам и витаминам антиоксидантного ряда питание крыс, приводило к увеличению продуктов свободнорадикального окисления липидов и снижению надежности ферментативной антиоксидантной системы крови, обусловленному в основном снижением активности селензависимой глутатионпероксидазы. Такое изменение прооксидантно-антиоксидантного баланса может приводить к возникновению окислительного повреждения и, как следствие, развитию иммунопатологического состояния организма.

Введение АДС-анатоксина контрольной и подопытной группам животных не оказывало существенного влияния на динамику изменения содержания гидроперекисей липидов, ферментативно-активного церулоплазмينا и активность супероксиддисмутазы крови крыс. Вместе с тем обнаруженное увеличение активности селензависимой глутатионпероксидазы в сыворотке крови подопытной группы крыс через 7 – 21 суток после введения АДС-вакцины может свидетельствовать о повышении надежности ферментативной защиты крови подопытной группы в процессе формирования иммунного ответа к дифтерийному и столбнячному анатоксином.

В связи с вышеизложенным, представляется целесообразным дальнейшее изучение взаимосвязи активности антиоксидантных ферментов крови с антителогенезом с целью разработки дополнительных тестов для раннего определения эффективности иммунизации.

## Выводы

1. Установлено, что несбалансированная по животным белкам и витаминам антиоксидантного ряда диета приводит к увеличению продуктов свободнорадикального окисления липидов и снижению надежности ферментативной антиоксидантной систе-

мы крови 3-месячных крыс, обусловленных в основном снижением селензависимой глутатионпероксидазной активности.

2. В процессе формирования иммунного ответа к дифтерийному и столбнячному анатоксинам в составе АДС-вакцины в сыворотке крови подопытных животных активность селензависимой глутатионпероксидазы увеличивалась на 7 – 21 сутки эксперимента.

#### 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., Кучма І.Ю., Іщенко Т.І. Вплив калорійно обмеженої дієти на активність прооксидантно-антиоксидантної системи крові щурів за умов імунізації АДП-анатоксином // Буковинський медичний вісник. – 2007. – Т. 11, № 3. – С. 115 – 118.
4. Волянський А.Ю., Никитченко Ю.В., Симиренко Л.Л., Іщенко Т.І., Кучма І.Ю. Вплив калорійно обмеженої дієти на стан ферментативної антиоксидантної системи крові щурів за умов імунізації // Медична хімія. – 2008. – Т. 10, № 1. – С. 10 – 14.
5. Волянський А.Ю., Симиренко Л.Л., Никитченко Ю.В., Іщенко Т.І., Кучма І.Ю. Гормональний статус щурів за умов імунізації АДП-анатоксином на тлі калорійно обмеженої дієти // Biomedical and Biosocial Anthropology. – 2007. – № 9. – С. 148 – 152.
6. Tkachenko V., Nikitchenko Yu., Tovstiak V. Prooxidant-antioxidant balance in rats liver microsomes under radiation and alimentary factors influence // Annales Universitatis Mariae Curie-Skłodowska, Lublin-Polonia. – 2004. – V. XVII, N 2, sectio DDD. – P. 289 – 291.
7. Никитченко Ю.В., Падалко В.И., Ткаченко В.Н., Золотухина А.А., Товстяк В.В. Влияние  $\gamma$ -излучения и алиментарных факторов на прооксидантно-антиоксидантную систему печени и крови крыс // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2008. – Т. 48, № 2. – С. 171 – 176.
8. Никитченко Ю.В. Роль алиментарных факторов в возрастных изменениях прооксидантно-антиоксидантной системы организма // Тез. VIII междунар. симп. «Биологические механизмы старения» (Харьков, 21 – 24 мая 2008 г.). – 2008. – С. 24.
9. Тутельян В.А. Стратегия разработки, применения, оценки эффективности биологически активных добавок к пище // Вопросы питания. – 1996. – № 6. – С. 3-11.
10. 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.
11. Asakawa T., Matsushita S. Coloring condition of thiobarbituric acid test for detecting lipid hydroperoxides // Lipids. – 1980. – V. 15, N 3. – P. 137 – 140.
12. 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.
13. 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.
14. Ravin H.A. Rapid test for hepatolenticular degeneration // Lancet. – 1956. – V. 1. – P. 7267 – 7271.
15. Матюшин Б.Н., Логинов А.С., Якимчук Г.Н. Оценка холестаза по отношению супероксиддисмутаза/церулоплазмин при гепатобилиарной патологии // Клини. лаб. диагностика. – 1992. – № 9 – 10. – С. 11 – 13.
16. Зуев И.В. Интенсивность перекисного окисления липидов печени при белково-энергетической недостаточности // Вопросы питания. – 1986. – № 2. – С. 53-57.
17. Волянський А.Ю., Никитченко Ю.В., Супрун Э.В., Симиренко Л.Л., Мизин В.В., Кучма І.Ю. Влияние тироксина на состояние прооксидантно-антиоксидантной системы крови крыс при иммунизации АДС-анатоксином // Вестник Харьк. нац. унта. № 774. Медицина. – 2007. – Вып. 14. – С. 5 – 9.
18. Волянський А.Ю., Никитченко Ю.В., Кучма І.Ю., Симиренко Л.Л. Влияние 1-метил-2-меркаптоимидазола на состояние прооксидантно-антиоксидантной системы крови крыс при иммунизации АДС-анатоксином // Annals of Mechnikov Institute. – 2008. – № 2. – С. 31-35. Web: <http://www.imiamn.org/journal.htm>

УДК 61:612.017:615.371

#### ВЛИЯНИЕ НЕСБАЛАНСИРОВАННОЙ ДИЕТЫ НА СОСТОЯНИЕ ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ КРОВИ КРЫС ПРИ ИММУНИЗАЦИИ АДС-АНАТОКСИНОМ

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

В экспериментах на 3-месячных крысах-самцах линии Wistar исследовали влияние двухмесячного несбалансированного по животным белкам и витаминам антиоксидантного ряда питания на состояние прооксидантно-антиоксидантного баланса крови при иммунизации АДС-анатоксином. Обнаружено увеличение продуктов свободнорадикального окисления липидов и снижение надежности ферментативной антиоксидантной системы крови подопытных животных, которое в значительной степени обусловило снижение активности селензависимой глутатионпероксидазы. Показано, что в процессе формирования иммунного ответа к дифтерийному и столбнячному анатоксинам в составе АДС-вакцины в сы-

воротке крови подопытных животных активность селензависимой глутатионпероксидазы увеличивалась на 7 – 21 сутки эксперимента.

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

**УДК 61:612.017:615.371**

**ВПЛИВ НЕЗБАЛАНСОВАНОГО ХАРЧУВАННЯ НА СТАН ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ КРОВІ ЩУРІВ ЗА УМОВ ІМУНІЗАЦІЇ АДП-АНАТОКСИНОМ**

**Волянський А.Ю., Нікітченко Ю.В., Кучма І.Ю., Смирненко Л.Л.**

У досліджах на 3-місячних щурах-самцях лінії Wistar вивчали вплив двохмісячного незбалансованого по тваринним білкам і вітамінам антиоксидантного ряду харчування на стан прооксидантно-антиоксидантного балансу крові при імунізації АДС-анатоксином. Виявлено збільшення вмісту продуктів вільнорадикального окислення ліпідів та зниження надійності ферментативної антиоксидантної системи крові дослідних тварин, яке в значній мірі зумовило зниження активності селензалежної глутатионпероксидази. Знайдено, що протягом формування імунної відповіді до дифтерійного та столбнячного анатоксинів, які входять до складу АДП-вакцини, у сироватці крові дослідних тварин активність селензалежної глутатионпероксидази збільшувалась на 7 – 21 добу експерименту.

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

**УДК 61:612.017:615.371**

**THE EFFECT OF NON-BALANCED NUTRITION ON THE STATE OF PROOXIDANT-ANTIOXIDANT SYSTEM IN BLOOD OF RATS UNDER ADT-IMMUNIZATION**

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

The effect of non-balanced on animal proteins and antioxidant vitamins nutrition on the activity of the prooxidant-antioxidant blood system in the process of immunization anatoxins of ADT-vaccine on 3-month old Wistar line rats was studied. The content of lipid hydroperoxides was increased and reliability of the enzymes of the antioxidant system was reduced. Both of these processes had resulted in the slowing of changes of glutathione peroxidase activity. The activity of glutathione peroxidase of the blood serum of the treated rats increased on the 7<sup>th</sup>- 21<sup>st</sup> days of the experiment in the process of the forming of humoral immune response to diphtheria and tetanus anatoxins of ADT-vaccine.

**Key words:** non-balanced nutrition, prooxidant-antioxidant balance, ADT-anatoxin, rats.