

УДК: 61:612.017:615.371

ВЛИЯНИЕ ТИРОКСИНА НА СОСТОЯНИЕ ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ КРОВИ КРЫС ПРИ ИММУНИЗАЦИИ АДС-АНАТОКСИНОМ

А.Ю. Волянский, Ю.В. Никитченко, Э.В. Супрун, Л.Л. Смирненко, В.В. Мизин, И.Ю. Кучма
Институт микробиологии и иммунологии имени И.И. Мечникова АМН Украины г. Харьков,
Украина

РЕЗЮМЕ

Исследована динамика изменения содержания гидроперекисей липидов, концентрации ферментативно-активного церулоплазмينا, супероксиддисмутазной и глутатионпероксидазной активности в сыворотке крови 3-месячных крыс при длительном введении тироксина, в процессе формирования на этом фоне иммунного ответа к дифтерийному и столбнячному анатоксинам (составляющим АДС-вакцины). Обнаружено, что в ответ на введение тироксина содержание продуктов перекисного окисления липидов увеличивалось, а активность антиоксидантных ферментов снижалась. Показано, что в процессе формирования иммунного ответа к дифтерийному и столбнячному анатоксинам АДС-вакцины в сыворотке крови гипертиреоидных крыс содержание ферментативно-активного церулоплазмينا и активность глутатионпероксидазы увеличивались.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: прооксидантно-антиоксидантный баланс, тироксин, АДС-анатоксин, крысы

Многочисленные исследования свидетельствуют, что состояние системы иммунитета в значительной степени зависит от гормонального статуса организма и, в особенности, от функционального состояния системы гипофиз-щитовидная железа [6, 7, 13]. Доказано нами, что изменение процесса формирования антиоксидантного иммунного ответа на дифтерийный и столбнячный анатоксины в составе АДС-анатоксина у крыс разного возраста тесно связаны с изменением тиреоидного статуса и прооксидантно-антиоксидантного баланса крови [1, 2, 4]. Определено также, что кратковременное и длительное введение тироксина крысам приводит к активации перекисного окисления липидов (ПОЛ) и накоплению продуктов свободнорадикального повреждения липидов и белков, которые связаны с увеличением генерации активных форм кислорода в редокс-цепях митохондрий и микросом [9-11]. С другой стороны, причиной накопления продуктов свободнорадикального повреждения биомолекул при гипертиреозе может быть снижение функции ферментативной и неферментативной антиоксидантной системы тканей [5, 12, 16, 18].

В связи с тем, что состояние прооксидантно-антиоксидантной системы тесно связано с иммунногормональным статусом организма, целью работы было исследование особенностей действия тироксина на содержание продуктов ПОЛ и активность антиоксидантных ферментов в сыворотке крови крыс при иммунизации АДС-анатоксином.

Работа выполнена в рамках НИР «Исследование влияния функциональных нарушений тиреоидного статуса организма на антителогенез при вакцинации в эксперименте»

(№ госрегистрации 0105U001109) Института микробиологии и иммунологии имени И.И. Мечникова АМН Украины.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование состояния прооксидантно-антиоксидантной системы крови при иммунизации на фоне введения тироксина (Т₄) проведено на 3-месячных крысах-самцах линии Вистар и выполнено с соблюдением правил Европейской конвенции по защите позвоночных животных (Страсбург, 1986), используемых для экспериментальных и научных целей. В опыте было 10 групп животных: 1 группа – контрольная, крысам вводили физиологический раствор внутрибрюшинно 1 раз в сутки в объеме 0,15 мл на 100 г массы тела; 2-10 группы – подопытные животные, которым в течение всего эксперимента вводили L-тироксин внутрибрюшинно 1 раз в сутки в дозе 50 мг на 100 г массы тела. Подопытным крысам 3, 5, 7, 9 и 10 групп после третьего введения гормона вводили АДС-анатоксин подкожно однократно в дозе 15 ЛФ дифтерийного и 5 ОЗ столбнячного анатоксинов в 0,25 мл препарата. Эта доза как минимально эффективная была заранее определена при разработке модели иммунного ответа на АДС-анатоксин [3]. Подопытные группы состояли из 3-4 животных, а контрольная – из шести.

Подопытных крыс выводили из опыта декапитацией через 3, 7, 14, 21 и 28 суток после иммунизации, что соответствовало 6, 10, 17, 24 и 31 суткам введения Т₄. Контрольных животных декапитировали через 6 суток после введения физиологического раствора. Кровь собирали, получали сыворотку и хранили ее на холоду до использования в опыте.

Измерение концентрации гидроперекисей липидов проводили по методу Asakawa [14]. Спектр поглощения окрашенного продукта регистрировали на двулучевом 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 $1,56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$.

Глутатионпероксидазную активность (КФ 1.11.1.9) определяли по методу Ланкина В.З. и соавт. [8] 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% тритон X-100 и 2 мМ азида Na для ингибирования каталазы. 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 $6,22 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$.

Супероксиддисмутазную активность (КФ 1.15.1.1) определяли как описано в работе [15]. Метод состоит в определении степени ингибирования реакции восстановления нитротетразолия синего супероксидными радикалами, которые генерируются с определенной скоростью в ксантин-ксантиноксидазной 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 нитротетразолий синий, 0,1 мМ ксантин, 0,003 ед. ксантиноксидазы. За единицу супероксиддисмутазной активности принимали 50% ингиби-

разолия синего при температуре 37°C. Супероксиддисмутазную активность регистрировали при 560 нм на двулучевом спектрофотометре Specord UV VIS (Германия) и рассчитывали в единицах активности на 1 мл сыворотки крови.

Содержание ферментативноактивного церулоплазмينا (КФ 1.16.3.1) определяли как описано в работе [17] в среде, содержащей 0,1 М ацетатного буфера (рН 5,5) и 0,1% парафенилендиамин. 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% азида натрия. Оптическую плотность окрашенных образцов регистрировали на двулучевом 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

Содержание гидроперекисей липидов в сыворотке крови крыс, получавших в течение 6 суток T_4 , существенно увеличивалось (на 34%) по сравнению с контрольными животными (табл. 1). В дальнейшем, через 10, 17 и 24 суток введения гормона, содержание этих продуктов ПОЛ в крови подопытных крыс оставалось на столь же высоком уровне. Введение на фоне T_4 АДС-анатоксина не оказывало влияния на динамику изменения концентрации гидроперекисей липидов.

рование скорости восстановления нитротет-

Таблица 1

Влияние тироксина на содержание гидроперекисей липидов и глутатионпероксидазную активность в сыворотке крови крыс при иммунизации АДС-анатоксином ($M \pm sd$)

| Группа животных | Гидроперекиси липидов, нмоль МДА/мл | Глутатионпероксидаза, мкмоль NADPH/мин·мл |
|----------------------|-------------------------------------|---|
| Контроль | $2,84 \pm 0,13$ | $1,23 \pm 0,17$ |
| T_4 , 6 сут | $3,81 \pm 0,15$ * | $1,02 \pm 0,14$ |
| T_4 , 6 сут + АДС | $3,63 \pm 0,31$ * | $0,66 \pm 0,04$ * |
| T_4 , 10 сут | $3,84 \pm 0,23$ * | $0,66 \pm 0,01$ * |
| T_4 , 10 сут + АДС | $3,91 \pm 0,19$ * | $0,66 \pm 0,12$ * |
| T_4 , 17 сут | $3,99 \pm 0,25$ * | $0,60 \pm 0,04$ * |
| T_4 , 17 сут + АДС | $3,94 \pm 0,10$ * | $1,00 \pm 0,08$ ** |
| T_4 , 24 сут | $3,94 \pm 0,10$ * | $0,67 \pm 0,03$ * |
| T_4 , 24 сут + АДС | $3,84 \pm 0,30$ * | $1,59 \pm 0,30$ ** |
| T_4 , 31 сут + АДС | $3,64 \pm 0,10$ | $1,78 \pm 0,16$ * |

* - $P < 0,05$ по сравнению с контролем;

** - $P < 0,05$ по сравнению с соответствующей группой животных, получавших только T_4 .

Активность фермента, утилизирующего гидроперекиси липидов, – глутатионпероксидазы значительно снижалась (в 1,9 раза) к 10 суткам введения T_4 и в дальнейшем оста-

валась на столь же низком уровне (табл. 1). Полученные результаты согласуются с данными других исследователей, которые показали снижение глутатионпероксидазной ак-

тивности в сердце гипертиреоидных крыс тией тиреоидных гормонов [12]. Введение на фоне T_4 АДС-анатоксина приводило к достоверному снижению глутатионпероксидазной активности уже к 6 суткам после начала эксперимента. В дальнейшем, к 17, 24 и 31 суткам, глутатионпероксидазная активность крови вакцинированных животных значительно увеличивалась. Так, к 17 и 24 суткам эксперимента (14 и 21 сутки после введения АДС-анатоксина) активность изучаемого фермента оказалась в 1,7 и 2,4 раза выше, чем у крыс, получавших только T_4 . Важно отметить, что к 31 суткам эксперимента (28 сутки после введения АДС-анатоксина) глутатионпероксидазная активность

[18] и в крови людей с повышенной продукцией превышала уровень аналогичной активности у контрольных животных практически в полтора раза.

Активность супероксиддисмутазы – фермента, утилизирующего супероксидные радикалы, – в ответ на введение T_4 снижалась (на 22%) к 6 суткам эксперимента и в дальнейшем, к 10, 17 и 24 суткам, оставалась на достоверно более низком уровне по сравнению с соответствующим показателем у контрольных животных (табл. 2). Введение на фоне T_4 АДС-анатоксина существенно не влияло на динамику изменений супероксиддисмутазной активности.

Таблица 2

Влияние тироксина на супероксиддисмутазную активность и содержание ферментативно-активного церулоплазмينا в сыворотке крови крыс при иммунизации АДС-анатоксинам ($M \pm sd$)

| Группа животных | Супероксиддисмутаза, усл.ед./мл | Церулоплазмин, мг/100 мл |
|----------------------|---------------------------------|--------------------------|
| Контроль | 264,9±15,9 | 15,07±0,51 |
| T_4 , 6 сут | 208,0±19,6 * | 11,05±1,80 * |
| T_4 , 6 сут + АДС | 194,3±19,9 * | 10,68±1,91 * |
| T_4 , 10 сут | 203,8±22,2 * | 8,99±2,51 * |
| T_4 , 10 сут + АДС | 212,7±10,7 * | 8,95±1,34 * |
| T_4 , 17 сут | 200,8±22,3 * | 9,39±1,10 * |
| T_4 , 17 сут + АДС | 217,6±1,6 * | 12,78±0,76 *** |
| T_4 , 24 сут | 202,1±23,5 * | 12,08±0,87 * |
| T_4 , 24 сут + АДС | 187,3±6,8 * | 16,10±1,07 ** |
| T_4 , 31 сут + АДС | 207,6±7,6 * | 14,35±1,95 |

* - $P < 0,05$ по сравнению с контролем;

** - $P < 0,05$ по сравнению с соответствующей группой животных, получавших только T_4 .

Содержание ферментативноактивного церулоплазмينا – второго белка сыворотки крови, способного эффективно утилизировать супероксидные радикалы, – в ответ на введение гормона значительно снижалось (в 1,7 раза) к 10 суткам эксперимента, а затем несколько увеличивалось к 24 суткам, оставаясь достоверно ниже уровня у контрольных крыс. У подопытных животных, получавших на фоне T_4 АДС-анатоксин, содержание ферментативно-активного церулоплазмينا на 6 и 10 сутки эксперимента (3 и 7 сутки после введения АДС-анатоксина) снижалось в 1,4 и 1,7 раза, соответственно, и затем, к 24 и 31 суткам (21 и 28 сутки после введения АДС-анатоксина), увеличивалось до уровня контрольных крыс. Обнаруженное увеличение (к 24 и 31 суткам эксперимента) содержания ферментативно-активного церулоплазмينا в сыворотке крови гипертиреоидных животных, получавших АДС-анатоксин, может объясняться тем фактом, что у эутиреоидных крыс формирование анатоксичного иммунного ответа на дифтерийный и столбнячный анатоксин связано со значительным увеличением концентрации церулоплазмينا в сыворотке [2].

Полученные данные свидетельствуют, что введение животным тироксина приводит к

увеличению содержания гидроперекисей липидов и снижению концентрации ферментативно-активного церулоплазмينا, супероксиддисмутазной и глутатионпероксидазной активности сыворотки крови. Такие изменения прооксидантно-антиоксидантного баланса могут приводить к возникновению окислительных повреждений и, как следствие, развитию иммунопатологического состояния организма. Введение на фоне тироксина АДС-анатоксина не оказывало влияния на динамику изменений концентрации гидроперекисей липидов и активности супероксиддисмутазы. Вместе с тем, обнаруженное увеличение концентрации ферментативно-активного церулоплазмينا и, особенно, активности глутатионпероксидазы в сыворотке крови гипертиреоидных крыс на поздних сроках после введения АДС-анатоксина может свидетельствовать о повышении функции ферментативной антиоксидантной защиты в крови подопытных животных в процессе формирования иммунного ответа к дифтерийному и столбнячному анатоксинам.

ВЫВОДЫ

1. Введение тироксина животным приводит к увеличению содержания продуктов

- ПОЛ в сыворотке крови и к снижению концентрации ферментативно-активного церулоплазмينا, активности супероксиддисмутазы и глутатионпероксидазы.
2. В процессе формирования иммунного ответа к дифтерийному и столбнячному анатоксинам в составе АДС-вакцины в сыворотке крови гипертиреоидных крыс содержание ферментативноактивного це-

рулоплазмина и активность глутатионпероксидазы увеличивалось.

Представляется целесообразным дальнейшее изучение изменений ферментативной антиоксидантной системы крови в зависимости от антигенной нагрузки и состояния системы гипопаратиреоидная железа с целью разработки дополнительных тестов эффективности иммунизации.

ЛИТЕРАТУРА

1. Волянський А.Ю., Никитченко Ю.В., Симиренко Л.Л. // Аналі Мечниківського інституту. - 2006. - № 3. - Web: <http://hniimi.da.ru.-Journal>.
2. Волянський А.Ю., Никитченко Ю.В., Симиренко Л.Л. и др. // Аналі Мечниківського інституту. - 2007. - № 2. - Web: <http://hniimi.da.ru.-Journal>.
3. Волянський А.Ю., Симиренко Л.Л., Кучма І.Ю. и др. // Інфекц. хвороби. - 2006. - № 4. - С. 62-65.
4. Волянський А.Ю., Симиренко Л.Л., Палій І.Г. та ін. // Biomedical and Biosocial Anthropology. - 2006. - № 7. - С. 159-164.
5. Данис Ю.К., Марчюленита Д.Ю., Даните Э.Ю. и др. // Пробл. эндокр. - 1990. - Т. 36 - № 5. - С.21-23.
6. Красных М.С., Бахметьев Б.А., Ширшев С.В. // Мед. иммунология. - 2003. - Т. 5. - № 3-4. - С.226 - 227.
7. Ланин Д.В., Шилов Ю.И., Ширшев С.В. // Мед. иммунология. - 2002. - Т. 4. - № 2. - С. 125-126.
8. Ланкин В.З., Гуревич С.М. // Докл. АН СССР. - 1976. - Т. 226. - № 3. - С. 705-708.
9. Лемешко В.В., Никитченко Ю.В. // Биохимия. - 1982. - Т. 47. - № 5. - С. 752-759.
10. Лемешко В.В., Никитченко Ю.В., Калиман П.А. // Укр. биох. журн. - 1983. - Т. 55. - №2. - С.206-209.
11. Никитченко Ю.В., Падалко В.И., Белостоцкая Л.И. и др. // Проблемы старения и долголетия. - 2005. - Т. 14. - прил. - С. 40-41.
12. Ademoglu E., Gokkusu C., Yarmen S., et al. // Pharmacol. Res. - 1998. - Vol. 38. - № 2. - P. 93-96.
13. Arpin C., Pihlgren M., Fraichard A. et al. // J. Immunol. - 2000. - Vol. 164. - № 1. - P. 152-160.
14. Asakawa T., Matsushita S. // Lipids. - 1980. - Vol. 15. - № 3. - P. 137-140.
15. Beavchamp C., Fridovich I. // Anal. Biochem. - 1971. - Vol. 44. - № 1. - P. 276-287.
16. Mano T., Shinohara R., Sawai Y. et al. // J. Endocrinol. - 1995. - Vol.145. - P. 131-136.
17. Ravin H.A. // Lancet. - 1956. - Vol. 1. - P. 7267-7271.
18. Shinohara R., Mano T., Nagasaka A. et al. // J. Endocrinol. - 2000. Vol. 164. - № 1. - P. 97-102.

ВПЛИВ ТИРОКСИНУ НА СТАН ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ КРОВІ ЩУРІВ ЗА УМОВ ІМУНІЗАЦІЇ АДП-АНАТОКСИНОМ

А.Ю. Волянський, Ю.В. Никитченко, Е.В. Супрун, Л.Л. Симиренко, В.В. Мізін, І.Ю. Кучма
Інститут мікробіології і імунології імені І.І. Мечникова АМН України, м. Харків, Україна

РЕЗЮМЕ

Досліджено динаміку змін вмісту гідроперекисів ліпідів, концентрації ферментативно-активного церулоплазмину та супероксиддисмутазної і глутатионпероксидазної активностей у сироватці крові 3-місячних щурів за тривалого введення тироксину та в процесі формування на цьому тлі імунної відповіді до дифтерійного та правцевого анатоксинів у складі АДС-вакцини. Виявлено, що у відповідь на введення тироксину вміст продуктів перекисного окислення ліпідів зростає, а активність антиоксидантних ферментів знижувалась. Показано, що в процесі формування імунної відповіді до дифтерійного та правцевого анатоксинів у складі АДС-вакцини у сироватці крові гіпертиреоїдних щурів вміст ферментативно-активного церулоплазмину та активність глутатионпероксидази зростали.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: прооксидантно-антиоксидантний баланс, тироксин, АДП-анатоксин, щури

THE EFFECT OF THYROXINE ON THE STATE OF PROOXIDANT-ANTIOXIDANT SYSTEM OF RAT BLOOD UNDER ADT-ANATOXIN IMMUNIZATION

A.Yu. Volyanskiy, Yu.V. Nikitchenko, E.V. Suprun, L.L. Simirenko, V.V. Misin, I.Yu. Kuchma
I.I. Mechnikov Institute of Microbiology and Immunology of the Academy of Medical Science of Ukraine, Kharkiv

SUMMARY

The dynamics of change of lipid hydroperoxides content, enzymatically active ceruloplasmin concentration, and superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities in blood serum of 3-month old rats under long-term administration of thyroxine and in the process of forming of immune response to diphtheria and tetanus anatoxins of ADT-vaccine was investigated. There was revealed that in response to thyroxine administration the content of lipid peroxidation products was increased and the activity of antioxidant enzymes was decreased. The content of enzymatically active ceruloplasmin and glutathione peroxidase activity were shown to be increased in blood serum of hyperthyroid rats in the process of forming of immune response to diphtheria and tetanus anatoxins of ADT-vaccine.

KEY WORDS: prooxidant-antioxidant balance, thyroxine, ADT-anatoxin, rats

УДК: 616.98: 579. 841. 11.

БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ НА РАЗЛИЧНЫХ ИСКУССТВЕННЫХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕДАХ

Н.И. Городницкая, А.В. Мартынов, Т.П. Осолодченко

Институт микробиологии и иммунологии имени И.И. Мечникова АМН Украины г. Харьков, Украина

РЕЗЮМЕ

В работе представлены результаты изучения биологических свойств вакцинного штамма *Pseudomonas aeruginosa* № 66-16 при культивировании на различных питательных средах. В результате проведенных исследований было установлено, что морфологические, культуральные и биохимические свойства не отличались при культивировании *Pseudomonas aeruginosa* на стандартных средах и на средах, полученных путем кислотного гидролиза продуктов переработки крови.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: штамм *Pseudomonas aeruginosa* № 66-16, биологические свойства, питательные среды

Синегнойная палочка является одним из главных этиологических факторов более чем 70% случаев гнойно-септических заболеваний, и борьба с этим заболеванием остается актуальной задачей современной медицины. Одной из проблем в лечении синегнойной инфекции является плазмидо-опосредованная множественная антибиотикорезистентность [1, 2].

В последние годы наблюдается быстрое развитие биотехнологии, поэтому наряду с антибиотиками широко используют в профилактике и лечении синегнойной инфекции продукты микробного происхождения – вакцины, анатоксины, бактериофаги. Важным этапом в создании технологии производства таких препаратов является подбор и оптимизация питательной среды для культивирования и наращивания биомассы продуцента. При производстве и разработке питательных сред особое внимание уделяется доступности сырья, где особое место занимают продукты службы крови (сыворотки, плазма, эритроцитарная масса, отходы гамаглобулинового производства) [3,4].

Целью нашей работы было сравнить биологические свойства вакцинного штамма *Pseudomonas aeruginosa* № 66-16, который используется в производстве анатоксина синегнойной палочки, а также вакцин и диагностических препаратов, при культивиро-

вании на стандартных питательных средах и средах, полученных из промышленных отходов крови.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для культивирования нами был использован штамм *Pseudomonas aeruginosa* № 66-16, который используется в разработках вакцин и анатоксинов. Штамм *Pseudomonas aeruginosa* культивировался в аэробных условиях при температуре 37 °С 18-24 часа на мясопептонном агаре с добавлением раствора 40% глюкозы. Культуру одновременно выращивали на средах Эндо, где можно было различить 5 типов колоний:

- 1) простые неправильной формы;
- 2) колонии, напоминающие колонии *E. coli* в S-форме;
- 3) складчатые (цветок маргаритки);
- 4) слизистые;
- 5) карликовые или точечные.

Также в опыт брали селективные среды 2-х типов. Первый тип – это среды с ацетамидом, где включение ацетамида как составной части такой среды обусловлено тем, что в отличие от других грамотрицательных микроорганизмов, а также от всех остальных видов *Pseudomonas*, синегнойная палочка обладает способностью использовать это соединение в качестве единственного источника азота и углерода. Второй тип – среды, в