

УДК 61:612.017:615.371

І.Ю.Кучма

ВПЛИВ ТИРЕОЇДНОГО СТАТУСУ НА ВМІСТ ГІДРОПЕРЕКИСІВ ЛІПІДІВ ТА ГЛУТАТІОНПЕРОКСИДАЗНУ АКТИВНІСТЬ КРОВІ ЩУРІВ ЗА УМОВ ІМУНІЗАЦІЇ АДП-АНАТОКСИНОМ

Інститут мікробіології та імунології ім. І.І.Мечнікова АМН України, м. Харків

Резюме. Досліджено вплив тиреоїдного статусу на вміст гідроперекисів ліпідів та глутатіонпероксидазну активність крові щурів за умов імунізації АДП-анатоксिनном. Виявлено, що на тлі уведення антитиреоїдного препарату мерказолілу, на відміну від уведення тироксину, вміст гідроперекисів ліпідів у крові зменшувався, а глутатіонпероксидазна активність збільшувалася. У процесі формування імунної відповіді до АДП-анатоксин динаміка зміни рівня гідроперекисів ліпідів у

крові гіпо-, гіпер- та еутиреоїдних тварин суттєво не відрізнялася. Глутатіонпероксидазна активність крові вакцинованих еутиреоїдних щурів залишалася на висхідному рівні, а в гіпо- й гіпертиреоїдних – на початкових термінах експерименту зменшувалася та в подальшому збільшувалася особливо в гіпертиреоїдних тварин.

Ключові слова: тиреоїдний статус, гідроперекиси ліпідів, глутатіонпероксидаза, АДП-анатоксин.

Вступ. Стан системи імунітету значною мірою залежить від гормонального статусу та стану прооксидантно-антиоксидантної системи організму [3, 8]. Згідно з даними літератури, вже через кілька хвилин після стимулювання імунокомпетентних клітин активується генерація супероксидного радикала та низку інших активних кисневих метаболітів (АКМ), які здійснюють мікробіцидну, цитотоксичну та імунорегуляторну дію [5, 8]. Яскравим підтвердженням вказаного є дані, які свідчать про генетично зумовлені порушення механізмів генерації супероксидного радикала (у хворих на хронічний гранулематоз або з дефіцитом мієлопероксидази) або його інгібування лікарськими препаратами, які призводять до зниження неспецифічного імунітету [5]. З іншого боку, надмірна генерація АКМ може призводити до вільнорадикального ушкодження клітин організму, перш за все імунокомпетентних клітин [5, 7]. При старінні, яке супроводжується збільшенням генерації АКМ у мітохондріях та зниженням надійності антиоксидантної системи, імунна функція організму погіршується, а при застосуванні низки природних та синтетичних антиоксидантів – суттєво покращується [7, 8].

Відомо, що стан прооксидантно-антиоксидантної системи значною мірою визначається тиреоїдним статусом організму [4, 6]. При короткочасному або тривалому уведенні тироксину тваринам вміст продуктів вільнорадикального окиснення біомолекул збільшується, а активність антиоксидантних ферментів, особливо селензалежної глутатіонпероксидази (ГП), знижується [4, 6]. При уведенні антитиреоїдного препарату мерказолілу (ММІ) або при моделюванні недостатнього рівня тиреоїдних гормонів застосуванням калорійно обмеженої дієти вміст продуктів вільнорадикального окиснення ліпідів зменшується, а активність селензалежної ГП у сироватці та еритроцитах крові щурів значно збільшується [1, 4, 9].

Мета дослідження. Дослідити вплив тироксину та антитиреоїдного препарату 1-метил-2-

меркаптоїмідазолу (мерказолілу) на вміст гідроперекисів ліпідів (ГПЛ) і активність ГП крові щурів на тлі імунізації АДП-анатоксिनном.

Матеріал і методи. Досліди проводили на 3-місячних щурах лінії Вістар та виконували відповідно до Європейської конвенції з питань етики по захисту хребетних тварин, яких використовують для експериментальних та наукових цілей (Страсбург, 1986 р.). Було сформовано три групи тварин: еутиреоїдні, гіпотиреоїдні та гіпертиреоїдні. Еутиреоїдна група складалася із двох підгруп: 1-а підгрупа – контрольна (6 тварин), щурам якої одноразово вводили підшкірно фізіологічний розчин у дозі 0,25 мл на 1 тварину; друга підгрупа – піддослідні еутиреоїдні щури (15 тварин), яким вводили АДП-анатоксин підшкірно в дозі 15 ЛФ дифтерійного та 5 ОЗ правцевого анатоксинів у 0,25 мл препарату. Цю дозу, як мінімально ефективну, обрано в попередньому дослідженні при розробці моделі імунної відповіді на АДП-анатоксин [2].

Еутиреоїдних тварин декапітували під легким ефірним наркозом через 3, 7, 14, 21 та 28 днів після імунізації. Контрольних тварин декапітували через три доби після уведення фізіологічного розчину.

Гіпотиреоїдна група складалася з трьох підгруп: 1-а – контрольна (7 тварин), щурам якої вводили фізіологічний розчин внутрішньошлунково раз на добу 0,15 мл на 100 г маси тіла; друга та третя підгрупи – піддослідні щури (34 тварини), яким протягом експерименту вводили внутрішньошлунково раз на добу ММІ в дозі 1 мг на 100 г маси тіла. Піддослідним гіпотиреоїдним щурам третьої підгрупи через 10 днів після ММІ вводили АДП-анатоксин у зазначеній дозі.

Гіпертиреоїдних щурів декапітували через 3, 7, 14, 21 та 28 днів після імунізації, що відповідало 13, 17, 24, 31 та 3-й добам уведення ММІ. Контрольних тварин декапітували через 13 днів після уведення фізіологічного розчину.

Гіпертиреоїдна група складалася з трьох підгруп: 1-а підгрупа – контрольна (6 тварин), щурам

якої вводили фізіологічний розчин внутрішньо-очеревинно раз на добу 0,15 мл на 100 г маси тіла; друга та третя підгрупи – піддослідні тварини, яким протягом експерименту вводили L-тироксин (T_4) внутрішньоочеревинно раз на добу в дозі 50 мг на 100 г маси тіла. Піддослідним гіпертиреїдним шурам третьої підгрупи після T_4 гормону вводили АДП-анатоксин у зазначеній дозі.

Піддослідних гіпертиреїдних тварин декапітували через 3, 7, 14, 21 та 28 діб після вакцинації, що відповідало 6, 10, 17, 24 та 31-й добам уведення T_4 . Контрольних тварин декапітували через 6 діб після уведення фізіологічного розчину. Кров для аналізів відбирали при декапітації тварин.

Спектр поглинання забарвленого продукту реєстрували на двопробному спектрофотометрі «Spectord UV VIS», різницю екстинкції вимірювали при 535 і 520 нм. Вміст гідроперекисів ліпідів розраховували в еквівалентній кількості малонового альдегіду, приймаючи коефіцієнт молярної екстинкції рівним $1,56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Глутатіонпероксидазну активність (КФ 1.11.1.9) визначали у 50 мМ K^+, Na^+ -фосфатному буфері (рН 7,4), який містив 1 мМ ЕДТА, 0,1 мМ NADPH, 1 од. глутатіонредуктази дріжджів, перекис водню - 0,4 мМ, 0,2 % розчин тритону X-100 та 3 мМ азиду Na для інгібування каталази. Реакцію проводили при температурі 37°C та постійному перемішуванні. Глутатіонпероксидазну активність реєстрували при 340 нм на двопробному спектрофотометрі Spectord UV VIS (Німеччина). Активність розраховували в нмоль NADPH/мл сироватки з використанням коефіцієнта молярної екстинкції $6,22 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Статистичну обробку результатів дослідження виконували на ПК за допомогою пакета прикладних програм "Excel". Вірогідно відмінними вважали результати при $P < 0,05$.

Результати дослідження та їх обговорення.

Наведені в табл. 1 дані свідчать, що вміст ГПЛ у сироватці еутиреїдних шурів у процесі формування імунної відповіді до дифтерійного та правцевого

анатоксинів у складі АДП-вакцини суттєво не змінювався протягом усіх термінів дослідження.

Вміст ГПЛ у сироватці гіпертиреїдних шурів, які отримували ММІ протягом 13 діб, вірогідно вищий (на 21,1 %, $P < 0,05$), ніж у контрольних тварин (табл. 1). У подальшому, через 17 діб уведення цього антиреїдного препарату, вміст ГПЛ зменшувався. За умов більш тривалого уведення ММІ (24 і 31 доба) вміст ГПЛ у сироватці піддослідних тварин зростав до рівня контрольних тварин. Уведення на тлі ММІ АДП-анатоксину суттєво не вплинуло на динаміку змін ГПЛ крові.

Вміст ГПЛ у сироватці тварин, які отримували протягом 6 діб T_4 , суттєво підвищився (на 34 %, $P < 0,05$) порівняно з контрольними тваринами (табл. 1). У подальшому, через 10, 17 та 24 доби уведення гормону, вміст цих продуктів ПОЛ у сироватці піддослідних шурів залишався на такому ж високому рівні. Уведення на тлі T_4 АДП-анатоксину не вплинуло на динаміку зміни концентрації ГПЛ.

Активність ферменту, що утилізує ГПЛ, – селеналежної ГП, у сироватці еутиреїдних шурів у відповідь на уведення АДП-анатоксину дещо знижувалась ($0,05 < P < 0,1$) на 3-ю добу експерименту, а в подальшому, на 7, 14, 21 та 28-у доби, – збільшувалася до рівня до контрольних величин (табл. 2).

ГП активність у сироватці крові гіпотиреоїдних шурів значно збільшувалася (на 79,9 %, $P < 0,05$) на 17-у добу уведення ММІ та в подальшому лише зберігала цю тенденцію до 31-ї доби експерименту (табл. 2). Наведені результати узгоджуються з раніше отриманими нами даними про значне збільшення ГП активності в крові піддослідних шурів, в яких зменшений рівень тиреоїдних гормонів моделювали за допомогою калорійно обмеженої дієти [1]. У зв'язку з цим зауважимо, що уведення екзогенного тироксину тваринам, які утримувалися на калорійно обмеженій дієті, призводило до вірогідного зменшення ГП активності [4].

Таблиця 1

Вплив тиреоїдного статусу на вміст гідроперекисів ліпідів у крові шурів за умов імунізації АДП-анатоксином (n=5-6)

Час після імунізації, доба	Еутиреїдні		Гіпотиреоїдні		Гіпертиреїдні	
	контроль	дослід	контроль	дослід	контроль	дослід
норма	3,29±0,22	3,29±0,22	2,98±0,19	2,98±0,19	2,84±0,13	2,84±0,13
3	3,20±0,40	2,58±0,27	2,35±0,09*	2,66±0,27	3,81±0,15*	3,63±0,31*
7	–	3,30±0,28	1,99±0,20*	2,02±0,23*	3,84±0,23*	3,91±0,19*
14	3,17±0,37	3,43±0,32	2,52±0,36	3,03±0,51	3,99±0,25*	3,94±0,10*
21	–	3,25±0,22	2,62±0,18	2,32±0,22	3,94±0,10*	3,84±0,30*
28	–	3,23±0,42	–	2,68±0,16	–	3,64±0,10*

Примітка. * – $P < 0,05$ порівняно з нормою; “–” – не визначали вміст гідроперекисів ліпідів

Таблиця 2

**Вплив тиреоїдного статусу на глутатіонпероксидазну активність у крові щурів
за умов імунізації АДП-анатоксином (n=5-6)**

Час після імунізації, доба	Еутиреоїдні		Гіпотиреоїдні		Гіпертиреоїдні	
	контроль	дослід	контроль	дослід	контроль	дослід
норма	1,52±0,08	1,52±0,08	1,39±0,16	1,39±0,16	1,23±0,17	1,23±0,17
3	1,50±0,07	1,29±0,07	2,15±0,44	1,25±0,30	1,02±0,14	0,66±0,04*
7	–	1,52±0,05	2,50±0,30*	1,88±0,30	0,66±0,01*	0,66±0,12*
14	1,46±0,11	1,35±0,11	2,58±0,33*	2,63±0,49*	0,60±0,04*	1,00±0,08**
21	–	1,32±0,11	3,66±0,28*	2,69±0,27**	0,67±0,03*	1,59±0,30**
28	–	1,48±0,17	–	4,24±0,56*	–	1,78±0,16*

Примітка. * – P<0,05 порівняно з нормою; ** – P<0,05 порівняно з відповідним контролем; “–” – не визначали глутатіонпероксидазної активності

Уведення АДП-анатоксину на тлі ММІ призводило до певного уповільнення селензалежної ГП активності крові гіпотиреоїдних тварин на 21-у добу після імунізації, тобто на 31-у добу після початку експерименту (табл. 2). Такі особливості зміни ГП активності в крові щурів, які отримували на тлі ММІ АДП-анатоксин, пояснюються зміною концентрації тиреоїдних гормонів в організмі в процесі формування імунної відповіді до дифтерійного та правцевого анатоксинів. Зокрема, нами доведено, що в еутиреоїдних тварин концентрація T₃ та T₄ у сироватці крові у відповідь на введення АДП-анатоксину суттєво збільшувалася на 7-у добу після імунізації та в подальшому, на 21-у добу експерименту, – нормалізувалася [3].

ГП активність сироватки крові гіпертиреоїдних щурів значно знижувалася (на 46,3 %, P<0,05) на 10-у добу введення T₄ і в подальшому залишалася на такому ж низькому рівні (табл. 2). Ці результати узгоджуються з даними інших дослідників, які показали зниження ГП активності в печінці, серці та крові гіпертиреоїдних щурів [4, 6]. Уведення АДП-анатоксину на тлі T₄ призводило до вірогідного зниження ГП активності вже на 6-у добу після початку експерименту (3-я доба після введення АДП-анатоксину). Більш раннє зниження ГП активності в сироватці крові вакцинованих гіпертиреоїдних щурів можна пояснити збільшенням концентрації ендогенних T₃ та T₄ у відповідь на введення АДП-анатоксину [3]. У подальшому, на 17, 24-у та 31-у доби, ГП активність крові вакцинованих гіпертиреоїдних тварин значно збільшувалась. Так, на 17-у і 24-у доби експерименту (14-а та 21-а доби після введення АДП-анатоксину на тлі T₄) активність досліджуваного ферменту на 66,7 % (P < 0,05) і 137,3 % (P < 0,05) відповідно вище, ніж у щурів, які отримували тільки T₄ (табл. 2). Важливо відмітити, що на 31-у добу експерименту (28-а доба після введення АДП-анатоксину) ГП активність у дослідних тварин перевищувала аналогічний рівень у контрольних тварин на 45 % (P<0,05). Таке зростання селензалежної ГП активності в сироватці

крові гіпертиреоїдних щурів у пізні терміни після введення АДП-анатоксину може свідчити про зростання надійності ферментативного антиоксидантного захисту крові піддослідних тварин.

Отже, зменшення рівня тиреоїдних гормонів в організмі при введенні ММІ призводить до зниження вмісту ГПЛ на 13-у та 17-у доби експерименту і значного зростання ГП активності крові піддослідних тварин. Збільшення ГП активності крові гіпертиреоїдних щурів може свідчити про зростання надійності ферментативного захисту від ГПЛ та пояснювати виявлене на ранніх етапах експерименту зменшення концентрації цих продуктів ПОЛ крові піддослідних тварин. Зростання ГП активності у відповідь на введення ММІ виявлено також і в гомогенатах серця та м'язів піддослідних щурів [11]. Важливо відмітити, що у відповідь на окиснювальний стрес, який моделюється в умовах *in vitro*, зростання інтенсивності хемілюмінесценції в гомогенатах серця та м'язів гіпотиреоїдних щурів дещо більше, ніж у еутиреоїдних тварин [9].

Збільшення рівня тиреоїдних гормонів при введенні тваринам тироксину призводило до збільшення вмісту ГПЛ і зниження ГП активності сироватки крові. Така зміна прооксидантно-антиоксидантного балансу в організмі гіпертиреоїдних тварин може спричиняти виникнення окиснювальних пошкоджень і, як наслідок, розвиток імунопатологічного стану.

У процесі формування імунної відповіді на дифтерійний та правцевий анатоксини в складі АДП-вакцини в сироватці крові еутиреоїдних щурів вміст ГПЛ і ГП активність вірогідно не змінювалися. Уведення гіпер- і гіпотиреоїдним тваринам АДП-анатоксину суттєво не вплинуло на динаміку коливань концентрації ГПЛ. Водночас зміни ГП активності у відповідь на введення АДП-анатоксину гіпер- і гіпотиреоїдним щурам вірогідно відрізнялися від зміни активності досліджуваного ферменту в невакцинованих піддослідних тварин. Виявлене уповільнення зростання ГП активності крові гіпотиреоїдних щурів та

більш виражене зниження досліджуваної активності в гіпертиреїдних тварин у ранні терміни формування імунної відповіді пояснювалося збільшенням рівня ендогенних тироксину і трийодтироніну у відповідь на уведення АДП-анатоксину. Встановлене значне зростання ГП активності крові гіпертиреїдних щурів на пізніх строках після вакцинації може свідчити про зростання ефективності ферментативного глутатіонзалежного антиоксидантного захисту піддослідних тварин у процесі формування гуморальної імунної відповіді до дифтерійного та правцевого анатоксинів.

Висновки

1. Уведення 1-метил-2-меркаптоїмідазолу тваринам призводить до зменшення концентрації гідроперекисів ліпідів на ранніх строках експерименту і до зростання активності селензалежної глутатіонпероксидази крові. Уведення тироксину тваринам спричиняє збільшення вмісту гідроперекисів ліпідів, а також суттєве зменшення глутатіон-пероксидазної активності крові.

2. У відповідь на уведення АДП-анатоксину гіпер- і гіпотиреїдним тваринам динаміка змін вмісту гідроперекисів ліпідів крові піддослідних щурів вірогідно не змінюється.

3. На ранніх строках формування імунної відповіді зміни глутатіонпероксидазної активності в крові гіпер- і гіпотиреїдних вакцинованих щурів зумовлені збільшенням концентрації ендогенних тироксину та трийодтироніну в тканинах піддослідних тварин.

4. Значне зростання глутатіонпероксидазної активності в крові гіпертиреїдних щурів на пізніх строках після уведення АДП-анатоксину свідчить про збільшення ефективності ферментативного глутатіонзалежного антиоксидантного захисту в процесі формування імунної відповіді на дифтерійний та правцевий анатоксини.

Перспективи подальших досліджень. Подальше дослідження змін активності ферментів, які утилізують супероксидні радикали, у крові щурів залежно від антигенного навантаження та тиреїдного статусу організму з метою розробки додаткових біохімічних тестів для раннього визначення ефективності імунізації.

Література

1. Вплив калорійно обмеженої дієти на активність прооксидантно-антиоксидантної систе-

ми крові щурів за умов імунізації АДП-анатоксином / А.Ю.Волянський, Ю.В.Никитченко, Л.Л.Симиренко [та ін.] // Бук. мед. вісник. – 2007. – Т. 11, № 3. – С. 115-118.

2. Моделювання процесу специфічного антигеногенезу за умов імунізації щурів АДП-анатоксином / А.Ю.Волянський, Л.Л.Симиренко, І.Ю.Кучма [та ін.] // Інфекційні хвороби. – 2006. – № 4. – С. 62-66.
3. Вікові особливості тиреїдного статусу щурів за умов імунізації АДП-анатоксином / А.Ю.Волянський, Л.Л.Симиренко, І.Г.Палій [та ін.] // Biomed. and Biosoc. Anthropology. – 2006. – № 7. – С. 159-164.
4. Нікітченко Ю. В. Роль тиреїдних гормонів у регуляції активності антиоксидантних ферментів за старіння щурів / Ю.В.Нікітченко, В.М.Дзюба, В.В.Бондар // Укр. біохім. ж. – 2002. – Т. 74, № 4а (додаток 1, Спец. випуск. Матер. VIII Укр. біохім. з'їзду, 1-3 жовтня 2002 р., м. Чернівці). – С. 64.
5. Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты / [Е.Б.Меньшикова, В.З.Ланкин, Н.К.Зенков и др.] – М.: Фирма "Слово", 2006. – 556 с.
6. Мембранные окислительные процессы при моделировании ускоренного старения длительным воздействием тироксина / Ю.В.Никитченко, В.И.Падалко, Л.И.Белостоцкая [и др.] // Пробл. старения и долголетия. – 2005. – Т. 14, приложение (Тези IV нац. конгр. геронтологів і геріатрів України, Київ, 11-13 жовтня 2005 р.). – С. 40.
7. The amount of thiolic antioxidant ingestion needed to improve several immune functions is higher in aged than in adult mice / M. De La Fuente, J.Miquel, M.P.Catalan [et al.] // Free Radical Research. – 2002. – Vol. 36, № 2. – P. 119-126.
8. Knight J.A. Review: free radicals, antioxidants and the immune system / J.A.Knight // Ann. Clin. Lab. Sci. – 2000. – Vol. 30. – P. 145-158.
9. Effect of thyroid state on lipid peroxidation, antioxidant defences and susceptibility to oxidative stress in rat tissues / P.Venditti, M.Balestrieri, S.Di Meo, T. De Leo // J. of Endocrinology. – 1997. – Vol. 155. – P. 151-157.

ВЛИЯНИЕ ТИРЕОИДНОГО СТАТУСА НА СОДЕРЖАНИЕ ГИДРОПЕРЕКИСЕЙ ЛИПИДОВ И ГЛУТАТИОНПЕРОКСИДАЗНУЮ АКТИВНОСТЬ КРОВИ КРЫС ПРИ ИММУНИЗАЦИИ АДС-АНАТОКСИНОМ

И.Ю.Кучма

Резюме. Исследовано влияние тиреидного статуса на содержание гидроперекисей липидов и глутатионпероксидазную активность крови крыс при иммунизации АДС-анатоксином. Обнаружено, что при введении антигипертиреидного препарата мерказолила, в отличие от тироксина, содержание гидроперекисей липидов в крови снижалось, а глутатионпероксидазная активность увеличивалась. В процессе формирования иммунного ответа к АДС-анатоксину динамика изменения уровня гидроперекисей липидов в крови гипо-, гипер- и эутиреидных животных существенно не изменялась. Глутатионпероксидазная активность крови вакцинированных эутиреидных крыс ос-

тавалась на исходном уровне, а у гипо- и гипертиреозидных на начальных сроках эксперимента снижалась и в дальнейшем увеличивалась более выражено у гипертиреозидных животных.

Ключевые слова: тиреозидный статус, гидроперекиси липидов, глутатионпероксидаза, АДС-анатоксин.

**INFLUENCE OF THE THYROID STATUS ON THE CONTENT OF LIPID
HYDROPEROXIDES AND GLUTATHIONE PEROXIDASE ACTIVITY
IN THE BLOOD OF RATS UNDER CONDITIONS OF
ADT-ANATOXIN IMMUNIZATION**

I. Yu. Kuchma

Abstract. The influence of the thyroid status on the content of lipid hydroperoxides and glutathione peroxidase activity in the blood of rats under conditions of ADT-anatoxin immunization has been investigated. It has been found that the content of lipid hydroperoxides was decreased and the glutathione peroxidase activity was increased against a background of injecting the antithyroid mercazolil preparation in contrast to a thyroxin injection. The dynamics of alterations in the content of lipid hydroperoxides did not change essentially in the blood of hypo-, hyper and euthyroid animals in the process of an immune response formation to ADT-anatoxin. The glutathione peroxidase activity of the vaccinated euthyroid animals remained at the initial level, but it was decreased and then increased in the blood of hypo- and hyperthyroid rats at the initial stages of the experiment, especially in hyperthyroid rats.

Key words: thyroid status, lipid hydroperoxides, glutathione peroxidase, ADT-anatoxin.

I.I.Mechnikov Institute of Microbiology and Immunology of Ukraine's AMS (Kharkiv)

Рецензент – проф. Г.І.Ходоровський

Buk. Med. Herald. – 2009. – Vol. 13, № 2. – P.78-82

Надійшла до редакції 22.01.2009 року

© І.Ю.Кучма

Науково-практична конференція

**“Стандарти діагностики та лікування
внутрішніх хвороб згідно з досягненнями
доказової медицини”**

**16 вересня 2009 року
м. Вінниця**

Адреса оргкомітету:

Вінницький національний медичний університет ім. М.І.Пирогова
МОЗ України
вул. Пирогова, 56
м. Вінниця, 21018
тел. (0432) 43-95-65