

УДК 61:612.017:615.371

А.Ю.Волянський, Ю.В.Никитченко, Л.Л.Смиренко, І.Ю.Кучма., Т.І.Іщенко

ВПЛИВ КАЛОРИЙНО ОБМЕЖЕНОЇ ДІЄТИ НА АКТИВНІСТЬ ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ КРОВІ ЩУРІВ ЗА УМОВ ІМУНІЗАЦІЇ АДП-АНАТОКСИНОМ

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

Резюме. Досліджено вплив калорійно обмеженої дієти (КОД) на стан прооксидантно-антиоксидантної системи крові в процесі формування гуморальної імунної відповіді до дифтерійного та правцевого анатоксинів АДП-вакцини в 3-місячних щурів лінії Вістар. У щурів на калорійно обмеженій дієті порівняно з щурами, що перебували на стандартному раціоні, вміст гідроперекисів ліпідів у сироватці крові був нижчим, а активність ферментів антиоксидантної системи - на більш підвищеному рівні. Формування гуморальної

імунної відповіді на АДП-анатоксин у щурів КОД-моделі відрізнялося від визначеної в щурів, що перебували на стандартному раціоні, за рівнем та тривалістю знаходження антиоксинів у кровотоці, та відбувалося на тлі підвищеної активності антиоксидантних ферментів крові при зниженому вмісті гідроперекисів ліпідів сироватки крові.

Ключові слова: АДП-анатоксин, антигілогенез, прооксидантно-антиоксидантна система крові, калорійно обмежена дієта, щури.

Вступ. Відповідно до імунологічної теорії старіння система імунітету з віком зазнає виражених змін, які зумовлюють зростання різних інфекційних захворювань, автоімунних процесів, пухлин і, як наслідок цього, скорочення строку життя [1-3]. Загальновідомо, що калорійно обмежена дієта збільшує тривалість життя, уповільнює вікові зміни імунної системи, зберігає її довше "молодою" [1]. Визначено вплив дієтарного складу харчування на стан прооксидантно-антиоксидантної системи організму. Калорійно обмежена дієта уповільнює генерацію активних форм кисню в редокс-ланцюгах клітини [4-6], знижує концентрацію продуктів перексидного окиснення ліпідів (ПОЛ) та збільшує активність ряду антиоксидантних ферментів [7,8]. Дослідження показали, що розвиток імунної відповіді за умов щеплення АДП-анатоксином супроводжується суттєвими віковими змінами активності ферментів антиоксидантної системи та вмісту ферменто-активного церулоплазміну в сироватці крові щурів [9].

Мета дослідження. З'ясувати вплив калорійно обмеженого харчування на стан прооксидантно-антиоксидантної системи організму за умов імунізації АДП-анатоксином.

Матеріал і методи. Дослідження впливу калорійно обмеженої дієти (КОД) на стан прооксидантно-антиоксидантної системи крові в процесі формування гуморальної імунної відповіді до дифтерійного та правцевого анатоксинів АДП-вакцини виконували в 3-місячних щурів лінії Вістар. Тварин переводили на експериментальне харчування в 1-місячному віці, якщо маса тіла досягала 60-70 г.

Експеримент проводили на 7 групах щурів: 1-ша група – контрольна, 2-га група отримувала 0,25 мл фізіологічного розчину; 3-7-ма групи – дослідні, тваринам вводили АДП-вакцину 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 [10]. Вакцину вводили підшкірно, о 10 годині ранку. Кожна група складалася з шести тварин. Зміни біохімічних показників досліджували до імунізації та в динаміці розвитку імунної відповіді: через 3, 7, 14, 21 та 28 діб після щеплення. Кров для аналізу відбирали шляхом декапітації тварин. Щурів 1-ї групи забивали до імунізації, а 2-ї групи – на третю добу після імунізації.

Антитіла до дифтерійного та правцевого анатоксинів АДП-вакцини визначали в сироватці крові в реакції пасивної гемаглютинації за допомогою стандартного комерційного "Діагностикума еритроцитарного дифтерійного антигенного рідкого", серія 59 – 63 з активністю 1:3200, та "Діагностикума еритроцитарного правцевого антигенного рідкого", серія 44 – 608 з активністю 1:1280, 1:2800, виготовлених АОВТ "Біомед" ім. І.І. Мечникова.

Вимірювання концентрації гідроперекисів ліпідів проводили за методом Asakawa et al. Спектр поглинання забарвленого продукту реєстрували на двопробеному спектрофотометрі Specord UV VIS, різниці екстинції вимірювали при 535 и 520 нм. Вміст гідроперекисів ліпідів розраховували в еквівалентній кількості малонового альдегіду, приймаючи коефіцієнт молярної екстинції рівним $1,56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Глутатіонпероксидазну активність (КФ 1.11.1.9) визначали за методом [18] 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% тритон X-100 та 3 мМ азиду Na для інгібування каталази. Реакцію проводили при температурі 37 °С та постійному перемішуванні. Глутатіонпероксидазну активність реєстрували при 340 нм на двопробеному спектрофотометрі Specord UV VIS (Німеччина). Активність виражали в нмоль NADPH/мл сироватки з урахуванням коефіцієнта молярної екстинції $6,22 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Оцінку супероксиддисмутазної активності (СОД) сироватки крові проводили за визначенням ступеня інгібіції реакції відновлення нітротет-

тразолію синього супероксидними радикалами, які генеруються з певною швидкістю в ксантиноксидантній реакції. За одиницю СОД приймали 50% інгібування швидкості відновлення нітротетразолію синього при температурі 37°C. СОД реєстрували при 560 нм на двопробеновому спектрофотометрі Spereord UV VIS (Німеччина) і розраховували в умовних одиницях (ум. од.) активності на 1 мл сироватки крові.

Вміст ферментативно-активного церулоплазміну (ЦП) сироватки крові визначали в середовищі, яке містило 0,1 М ацетатного буфера, рН 5,5 та 0,1% парафенілендіамін. Активність забарвлених зразків реєстрували на спектрофотометрі "Spereord UV VIS" (Німеччина) при 530 нм, вміст ЦП означали в мг/100мл сироватки крові.

Статистичну обробку результатів дослідження виконували на ПК за допомогою пакета прикладних програм "Excel".

Експерименти виконано відповідно до Європейської конвенції з питань етики по захисту хребетних тварин, яких використовують для експериментальних та наукових цілей (Страсбург, 1986 р.).

Результати дослідження та їх обговорення.

Утримання щурів на калорійно обмеженій дієті призводило до значної зміни прооксидантно-антиоксидантного балансу крові (табл. 1).

Вміст гідроперекисів ліпідів знижувався на 33,4% порівняно з тваринами, які знаходилися на стандартній дієті. При цьому активність основного ферменту, що утилізує ці продукти ПОЛ, значно збільшувалась. Так, порівняно з контрольними щурами, активність глутатіонпероксидази зростала більш, ніж у 3 рази. Вміст ферментативно-активного церулоплазміну зростав у 1,26 раза, при цьому супероксиддисмутазна активність істотно не змінювалась.

Таким чином, у щурів, які отримували калорійно обмежений раціон, вміст продуктів ПОЛ знижувався, а активність антиоксидантних ферментів, особливо глутатіонпероксидази, зростала.

Визначено зміни в процесі формування гуморальної імунної відповіді на імунізацію АДП-анатоксином щурів, що утримувалися на калорійно обмеженому, але повноцінному за кількістю тваринного білка, вітамінів та мінералів раціоні. Активність специфічного антитілогенезу в щурів КОД-моделі відрізнялася від визначеної в щурів на стандартному раціоні (табл. 2).

У тварин КОД-моделі, порівняно з інтактними щурами дифтерійні антитоксини з'являлися у кровотоці раніше (на 7-му добу), вірогідно перевищували рівень у інтактних тварин на 14-ту добу (на 0,043 МО/мл), продовжували зростати на 21-шу добу (на 0,632 МО/мл; $P \leq 0,01$) і, на відміну від зниження на 28-му добу в контрольних тварин, зростали до кінця експериментального періоду. На 28-му добу їх рівень на 0,625 МО/мл ($P \leq 0,05$) перевищував визначений у інтактних тварин. Правцеві антитоксини з'являлися в сироватці крові щурів КОД-моделі на 14-ту добу після щеп-

лення. Їх кількість зростала до 21-ї доби на 0,771 МО/мл ($P \leq 0,01$), після чого до 28-ї доби практично не змінювалася. Концентрація протиправцевих антитіл сироватки крові протягом формування імунної відповіді на 14-ту та 21-шу добу практично не відрізнялася від визначеної у тварин на стандартному раціоні. На 28-му добу після щеплення рівень антитіл на 0,893 МО/мл ($P \leq 0,05$) нижчий за аналогічний у інтактних тварин.

Визначено суттєві особливості стану прооксидантно-антиоксидантної системи крові щурів КОД-моделі, що супроводжували формування гуморальної імунної відповіді (табл. 3).

Вміст продуктів ПОЛ у сироватці крові щурів вірогідно не змінювався в жодній з досліджених груп тварин. Супероксиддисмутазна активність сироватки крові щурів КОД-моделі у відповідь на уведення АДП-анатоксину декілька знижувалась на 3-тню добу експерименту, а на 7-му добу зростала ($P < 0,05$ порівняно з рівнем на 3-тню добу після щеплення). У подальшому, на 14-ту та 21-шу добу після уведення препарату активність СОД сироватки крові була вірогідно нижче рівня на 7-му добу експерименту, але вірогідно не відрізнялася від активності в щурів контрольної групи та тих, що утримувалися на стандартному раціоні (табл. 1, 3).

Вміст ферментативно-активного церулоплазміну сироватки крові щурів КОД-моделі при формуванні реакції відповіді на імунізацію значно знижувався на 3-тню та 7-му добу після щеплення. Слід відмітити, що у тварин, які утримувалися на стандартній дієті, цей показник на ранніх термінах експерименту значно зростав [9]. На 14-ту добу після імунізації активність ЦП сироватки крові щурів КОД-моделі зростала та перевищувала рівень у тварин контрольної групи (на 32%, $P \leq 0,05$). У подальшому, на 28-му добу експерименту, активність ферменту знижувалася до рівня у тварин контрольної групи.

Активність селензалежної глутатіонпероксидази сироватки крові щурів КОД-моделі у відповідь на уведення АДП-анатоксину зростала на 14-ту добу експерименту в 1,55 раза ($P \leq 0,05$), а на 28-му добу знижувалася до рівня активності у тварин на стандартному раціоні.

Таким чином, імунізація щурів АДП-анатоксином на тлі калорійно обмеженого харчування не супроводжувалася значними змінами вмісту гідроперекисів ліпідів у сироватці крові. Найбільш виразні зміни встановлені при вивченні глутатіонпероксидазної активності та вмісту ферментативно-активного церулоплазміну. При цьому слід відмітити, що за умов імунізації зміни активності ферментів сироватки крові щурів, що утримувалися на калорійно обмеженій дієті, більш виражені порівняно з щурами, які одержували стандартний раціон харчування [9].

У тварин зі стрес-індукованими змінами захисних функцій організму (КОД-модель) та в інтактних щурів лінії Вістар формування імунної відповіді на АДП-анатоксин відрізнялося часом

Таблиця 1

Вплив калорійно обмеженої дієти на прооксидантно-антиоксидантну рівновагу в сироватці крові щурів

Параметри, що досліджувались	Стандартна дієта	Калорійно обмежена дієта
Гідроперекиси ліпідів, нмоль МДА/мл	3,29±0,22	2,19±0,10*
Глутатіонпероксидазна активність, мкмоль/NADPH хв·мл	1,52±0,08	5,22±0,43*
Супероксиддисмутазна активність, ум. од./мл	271,9±8,0	300,6±20,8
Церулоплазмін, мг/100 мл	15,0±0,9	18,9±1,3*

Примітка. * – P<0,05; P – вірогідність різниці відносно рівня у щурів, що перебували на стандартній дієті

Таблиця 2

Концентрація специфічних антитіл сироватки крові щурів на стандартній та калорійно обмеженій дієті в динаміці імунної відповіді на АДП-анатоксин (M±m, MO/мл)

Антитіла	Протидифтерійні		Противправцеві	
	Стандартна дієта	Калорійно обмежена дієта	Стандартна дієта	Калорійно обмежена дієта
Термін після імунізації, доба				
3-тя	0	0	0	0
7-ма	0	0,002±0,001	0	0
14-та	0,007	0,050±0,012*	0,150±0,001	0,177±0,049
21-ша	1,000±0,006	0,682±0,116	1,0±0,006	0,948±0,218
28-ма	0,125±0,001	0,750±0,118*	2,0±0,012	1,107±0,173*

Примітка. * – P<0,05; P – вірогідність різниці відносно рівня при імунізації щурів на стандартному раціоні

Таблиця 3

Стан прооксидантно-антиоксидантного балансу сироватки крові щурів на калорійно обмеженій дієті у динаміці імунної відповіді на АДП-вакцину

Термін, доба	Показники								
	Гідроперекиси ліпідів, нмоль МДА/мл		Глутатіонпероксидаза, мкмоль NADPH/хв·мл		Супероксиддисмутаза, ум. од./мл		Церулоплазмін, мг/100 мл		
	Інтактні щури	КОД-модель	Інтактні щури	КОД-модель	Інтактні щури	КОД-модель	Інтактні щури	КОД-модель	
До імунізації (контроль)	3,20±0,40	2,23±0,16	1,50±0,07	5298,0 ±811,8	271,0 ±10,4	314,8 ±20,4	14,1±1,3	19,1±1,5	
Після імунізації	3-тя	2,58±0,27	2,32±0,31	1,29±0,07	4780,0 ±1220,3	273,7 ±14,0	275,6 ±16,9	23,5±3,7*	14,6±3,3
	7-ма	3,30±0,28	2,39±0,32	1,52±0,05	6110,0 ±1290,4	305,1 ±14,7	329,1 ±9,6**	18,5±1,4*	10,2±2,3*
	14-та	3,43±0,32	2,05±0,09	1,35±0,11**	8225,0 ±916,5*	242,2 ±11,7***	241,5 ±17,2*	15,8±1,8	25,2±1,1* ***
	21-ша	3,25±0,22	2,44±0,25	1,32±0,11	8207,5±857,5*	232,9 ±18,0***	222,2 ±5,2*	13,1±1,2	22,1±1,5***
	28-ма	3,23±0,42	2,23±0,31	1,48±0,17	5550,0 ±1050,0	257,2 ±41,3	267,7 ±22,9	15,5±3,8	19,5±1,1***

Примітка. * – P<0,05 порівняно з рівнем у контрольній групі; ** – P<0,05 – порівняно з групою на 3-тю добу після імунізації; *** – P<0,05 порівняно з групою на 7-му добу після імунізації

появи антиоксидантних антитіл, терміном досягнення максимального рівня і тривалістю його перебування у кровотоці. Виявлені зміни активності антиоксидантних ферментів сироватки крові щурів свідчать як за певної ролі цієї антиоксидантної системи в механізмах формування імунної відповіді на уведення АДП-анатоксину, так і щодо можливості використання динаміки змін окремих показників цієї системи як критерій для розробки біохімічних прогностичних тестів формування гуморальної імунної відповіді. Дослідження по визначенню взаємозв'язку між станом прооксидантно-антиоксидантної системи та активністю специфічного антигілогенезу до дифтерійного та правцевого анатоксинів у динаміці

формування антиоксидантного імунітету під впливом АДП-вакцини мають бути подовжені.

Висновки

1. У щурів на калорійно обмеженій дієті порівняно з рівнем у щурів, що перебували на стандартному раціоні, вміст гідроперекисів ліпідів у сироватці крові нижчий, а активність ферментів антиоксидантної системи – на більш підвищеному рівні.

2. Формування антиоксидантної імунної відповіді на АДП-анатоксин у щурів КОД-моделі відрізнялося від визначеної в щурів, що перебували на стандартному раціоні, за рівнем та тривалістю знаходження антиоксидантів у кровотоці.

3. При формуванні гуморальної імунної відповіді прооксидантно-антиоксидантний баланс крові в щурів КОД-моделі відрізнявся від визначеного в інтактних тварин.

4. Формування гуморальної імунної відповіді на АДП-анатоксин у щурів КОД-моделі відбувалося на тлі підвищеної активності антиоксидантних ферментів крові при зниженому вмісті гідроперексидів ліпідів сироватки крові.

Перспектива наукового пошуку полягає у дослідженні калорійно обмежувальної дієти на стан прозапальних та протизапальних цитокінів за умов імунізації АДП-анатоксином.

Література

1. Бутенко Г.М. Старение иммунной системы // Пробл. старения и долголетия. – 1998. – Т. 7, № 3. – С. 251–258.
2. Анисимов В.Н., Соловьев М.В. Эволюции концепций в геронтологии. –С-Пб: Эскулап, 1999. – 30 с.
3. Brian T. Weinert and Poala S. Timiras. Invited Review: Theories of aging // Appl. Physiol. – 2003. – V. 95. – P. 1706–1716.
4. Lopez-Torres M., Gredilla R., Sanz A., Barja G. Influence of aging and long-term caloric restriction on oxygen radical generation and oxidative DNA damage in rat liver mitochondria // Free Radic. Biol. Med. – 2002. – V. 32, № 9. – P. 882–889.
5. Wei Y.H., Lee H.C. Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and impairment of antioxidant enzymes in aging // Exp. Biol. Med. (Maywood). – 2002. – V. 227, № 9. – P. 671–682.
6. Gredilla R., Barja G. Minireview: The role of oxidative stress in relation to caloric restriction and longevity // Endocrinol. – 2005. – V. 146, N 9. – P. 3713–3717.
7. Gomi F., Matsuo M. Effects of aging and food restriction on the antioxidant enzyme activity of rat livers // J. Gerontol. Biol. Sci. Med. Sci. – 1998. – V. 53, № 3. – P. B161–B167.
8. Baek B.S., Kwon H.J., Lee K.H. et al. Regional difference of ROS generation, lipid peroxidation and antioxidant enzyme activity in rat brain and their dietary modulation // Arch. Pharm. Res. – 1999. – V. 22, № 4. – P. 361–366.
9. Волянський А.Ю., Никитченко Ю.В., Смирченко Л.Л., Іщенко Т.І., Кучма І.Ю. Супероксиддисмутазна активність та вміст ферментативно-активного церулоплазміну сироватки крові щурів різного віку за умов імунізації АДП-анатоксином // Аналі Мечниківського інституту. – 2007. – № 2. – Web: <http://hniimi.da.ru.-Journal>.
10. Волянський А.Ю., Смирченко Л.Л., Кучма І.Ю., Никитченко Ю.В., Крестецька С.Л. Моделювання процесу специфічного антилітогенезу за умов імунізації щурів АДП-анатоксином // Інфекційні хвороби. – 2006. – № 4. – С. 62–66.

ВЛИЯНИЕ КАЛОРИЙНО ОГРАНИЧИТЕЛЬНОЙ ДИЕТЫ НА АКТИВНОСТЬ ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ КРОВИ КРЫС ПРИ ИММУНИЗАЦИИ АДП-АНАТОКСИНОМ

А.Ю.Волянский, Ю.В.Никитченко, Л.Л.Смирченко, И.Ю.Кучма, Т.И.Ищенко

Резюме. Исследовано влияние калорийно ограничительной диеты (КОД) на состояние прооксидантно-антиоксидантной системы крови в процессе формирования гуморального иммунного ответа к дифтерийному и столбнячному анатоксину АДП-вакцины в 3-месячных крыс линии Вистар. У крыс с калорийно ограничительной диетой в сравнении с крысами, что находились на стандартном рационе, содержание гидроперексидов липидов в сыворотке крови было ниже, а активность ферментов антиоксидантной системы – на более высоком уровне. Формирование гуморального иммунного ответа на АДП-анатоксин в крыс КОД-модели отличалось от животных, которые пребывали на стандартном рационе, по уровню и длительностью нахождения антитоксинов в крови, и происходило на фоне повышенной активности антиоксидантных ферментов крови при сниженном содержании гидроперексидов липидов сыворотки крови.

Ключевые слова: АДП-анатоксин, антилитогенез, прооксидантно-антиоксидантная система крови, калорийно ограничительная диета, крысы.

THE EFFECT OF CALORY-RESTRICTED DIET ON THE ACTIVITY OF THE PROOXIDANT-ANTIOXIDANT SYSTEM IN RAT BLOOD UNDER CONDITIONS OF ADT-ANATOXIN IMMUNIZATION

A.Y.Volians'kyi, Yu.V.Nykytchenko, L.L.Symyrenko, I.Yu.Kuchma, T.I.Ishchenko

Abstract. The effect of low-calorie diet (LCD) on the activity of the prooxidant-antioxidant blood system in the process of the forming of humoral immune response to diphtheria and tetanus anatoxins of ADT-vaccine in 3-month old Wistar line rats was investigated. The content of lipid hydroperoxides in the blood serum was lower, whereas the activity of the enzymes of the antioxidant system was at a more elevated level in the rats on a low-calorie diet compared with the rats that were fed a standard ration. The forming of humoral immune response to ADT-anatoxin in the rats of the LCD model differed from that determined in the rats that were on a standard ration by the level and duration of the presence of antitoxins in the bloodstream and it proceeded against a background of an enhanced activity of the blood antioxidant enzymes with a diminished content of the blood serum lipid hydroperoxides.

Key words: ADT-anatoxin, antibody genesis, blood prooxidant-antioxidant system, low-calorie diet, rats.

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

Рецензент – проф. Ю.Є.Роговий

Buk. Med. Herald. – 2007. – Vol.11, №3. – P.115-118

Надійшла до редакції 19.06.2007 року