

*Mokslinis straipsnis*

## Vilniaus miesto ilgaamžių imunologinių ir oksidacinio streso rodiklių tyrimas

**E. Redaitienė, B. Butkienė, D. Vipartienė, R. Filipavičiūtė, B. Gaigalienė, V. Alekna**

Vilniaus universiteto Eksperimentinės ir klinikinės medicinos institutas

### **Santrauka**

*Darbo tikslas* – ištirti Vilniaus miesto ilgaamžių kraujo imunologinius rodiklius (limfocitų blasttransformaciją ir antikūnus prieš natyvinę DNR) ir pro-/antioksidacinės sistemos komponentus (malondialdehido kiekį – MDA ir fermentų superoksido dismutazės – SOD ir gliutatio peroksidazės – GPO aktyvumą).

*Tiriamieji asmenys ir tyrimo metodikos.* Imunologiniai rodikliai ištirti 47 Vilniaus miesto ilgaamžiams (amžiaus vidurkis –  $91 \pm 2,4$  metų) ir 22 pagyvenusio amžiaus (amžiaus vidurkis –  $68,2 \pm 2,2$  metų) asmenims. Limfocitų funkcinis aktyvumas nustatytas *in vitro* blasttransformacijos reakcija, panaudojant fitohemaglutininą (FHA). Antikūnai (AK) prieš natyvinę DNR (ds-DNR) nustatyti ELISA metodu, naudojant plokštelių rinkinį (INOVA diagnostics, Inc. San Diego, CA 92131).

Pro-/antioksidacinės sistemos rodikliai ištirti 31 ilgaamžiui. Tiriamųjų amžiaus vidurkis –  $92 \pm 2,1$  metų. Kontrolinę grupę sudarė 10 vidutinio amžiaus (amžiaus vidurkis –  $56,4 \pm 8,98$  metų) asmenų. MDA kiekio kraujo serume nustatymui naudota reakcija su tiobarbitūrinu rūgštimi. SOD aktyvumas eritrocituose ir GPO kraujyje nustatytas naudojant anglų firmos „Ran-

dox Laboratories Ltd.“ „Ransod“ ir „Ransel“ rinkinius pagal gamintojų aprašytas metodikas.

Duomenų analizė atlikta naudojant kompiuterinę statistinę programą „Statistic for Windows“.

*Rezultatai.* Ilgaamžių grupėje periferinio kraujo limfocitų atsakas į nespecifinį mitogeną FHA buvo ryškiai sumažėjęs. MDA kiekis, atspindintis oksidacijos procesų intensyvumą, ilgaamžių kraujyje buvo padidėjęs, o antioksidacinių fermentų SOD ir GPO aktyvumas – ryškiai sumažėjęs.

*Išvados.* Tirtųjų Vilniaus miesto ilgaamžių limfocitų funkcija buvo susilpnėjusi. Ilgaamžių pro-/antioksidacinės sistemos rodiklių tyrimas parodė, kad intensyvių oksidacijos procesų nekompensavo fermentinės ginamosios sistemos ir pasireiškė oksidacinis stresas.

### **Raktažodžiai:**

ilgaamžiai, imunologiniai rodikliai, malondialdehidas, superoksido dismutazė, gliutatio peroksidazė

### **Įvadas**

Sunku vienareikšmiai įvardyti senėjimo priežastis, jo biocheminius, imunologinius ir kitus žymenis dėl šio proceso sudėtingumo ir skirtingumo įvairiose ląstelėse ir audiniuose. Aiškinantis biologinius senėjimo mechanizmus yra sukurtos kelios teorijos. Imunologinė senėjimo teorija remiasi dviem pagrindiniais faktais, kad senstant keičiasi

*Adresas:* B. Butkienė  
Žygimantų 9, LT-01102 Vilnius  
Tel.: (8-5) 2628841  
Faksas (8-5) 2123073  
El. paštas [birute.butkiene@ekmi.vu.lt](mailto:birute.butkiene@ekmi.vu.lt)

imuninės sistemos funkcinis pajėgumas, t. y. sumažėja T limfocitų atsakas į mitogenus ir atsparumas infekcinėms ligoms ir sustiprėja autoimuninės reakcijos, padidėja serumo autoantikūnų [1–3]. Nors ir nustatyti įvairių imunologinių parametru pokyčiai senstančių ir ilgaamžių žmonių grupėse, tačiau egzistuoja stipri tiesioginė imuniteto rodiklių ir sveikatos būklės koreliacija [2].

Laisvaradikalinės (oksidacinio streso) teorijos šalininkai teigia, kad dauguma su amžiumi siejamų sutrikimų priklauso nuo organizmo biomolekulių pažeidimų laisvaisiais radikalais (LR) [3, 4]. LR – tai atomai, molekulės, turintieji išorinėje orbitoje nesuporintų elektronų ir dėl to yra reaktyvūs ir reaguoja su organiniais ir neorganiniais junginiais juos oksiduodami. Dėl LR poveikio kinta baltymai (paveikiamos jų sulfhidrilinės grupės, oksiduojamos aminorūgščių šoninės grandinės). LR gali sukelti ląstelėse DNR pažeidimą, oksiduoti membranų lipidų polinesočiasias riebalų rūgštis, o susidarę jų peroksidai – kitą nesočiąją riebalų rūgštį ir t. t. Žmogaus organizmo ląstelės turi įvairius mechanizmus žalingam LR poveikiui mažinti ir neutralizuoti. Tai nefermentinės (E, C vitaminai bei karotiniai, taip pat bilirubinas, šlapimo rūgštis ir koenzimas Q) ir fermentinės (superoksido dismutazė, katalazė ir gliutaciono peroksidazė) ginamosios sistemos. Kai nėra pusiausvyros tarp susidarančių LR ir antioksidacinių mechanizmų organizme susidaro oksidacinio streso būklė. Oksidacinį stresą kai kurie autoriai įvardija biologiniu senėjimo žymeniu [4, 5]. Pabrėžiama, kad LR yra ne tik biologinio senėjimo, bet ir daugelio degeneracinių procesų (vėžio, aterosklerozės, imunodeficitų, smegenų disfunkcijų ir kt.) priežastis [7, 8]. Tuo tarpu aukštas nefermentinių ir fermentinių antioksidantų lygis yra sveiko ilgaamžiškumo garantas [5]. Ląstelių membranų lipidai labai nukentčia nuo nekompensuoto LR oksidacinio aktyvumo, ir jų peroksidacija stiprėja pailgėjus senatvei [6]. Vienas galutinių lipidų peroksidų skilimo produktų yra malondialdehidai (MDA), ir jo kiekio padidėjimas kraujo serume yra vykstančių intensyvių oksidacijos procesų rezultatas. Daugelio autorių nuomone, MDA yra audinių pažeidimo ir oksidacinio streso žymuo [7, 9, 10].

**Šio darbo tikslas** buvo nustatyti kai kurių imunologinių rodiklių galimus pokyčius, įvertinant periferinio kraujo limfocitų reakciją į nespecifinį mitogeną bei tiriant antikūnus prieš natyvinę (dvispiralę) dezoksiribonukleino rūgštį (ds-DNR) Vilniaus miesto ilgaamžių (90 m. ir vyresnių asmenų) grupėje. Galimo oksidacinio streso pasireiškimui įvertinti ilgaamžių grupėje buvo tiriami pro-/antioksidacinės sistemos komponentai: MDA koncentracija ir antiok-

sidacinių fermentų superoksido dismutazės (SOD) ir gliutaciono peroksidazės (GPO) aktyvumas kraujyje.

### **Tiriami asmenys ir tyrimo metodikos**

Imunologiniai rodikliai ištirti 47 Vilniaus mieste gyvenantiems ilgaamžiams (27 moterims ir 20 vyrų). Kontrolinę grupę sudarė pagyvenę (60–70 m.) 22 vilniečiai (8 vyrai ir 14 moterų).

Limfocitų funkcinis aktyvumas buvo nustatomas *in vitro* limfocitų blasttransformacijos reakcija, panaudojant nespecifinį mitogeną – fitohemagliutiną (FHA). Tam tikslui buvo naudojama 72 val. limfocitų kultūra su 50 μ FHA. Limfocitų blastogeninio atsako sumažėjimas daugiau nei 20% buvo vertinamas kaip limfocitų funkcinio aktyvumo sumažėjimas.

Antikūnai (AK) prieš ds-DNR buvo nustatomi pusiau kiekybiniu ELISA metodu, panaudojant plokštelių rinkinį (INOVA diagnostics, Inc. San Diego, CA 92131), pagal gamintojų aprašytą metodiką ir rezultatus vertinant automatinio spektrofotometru (Labsystems Multiscan MS), kai bangos ilgis 492 nm. AK prieš ds-DNR kiekis tirtuose serumuose buvo apskaičiuojamas panaudojus kalibracinę kreivę, kur optinis tankis perskaičiuotas į tarptautinius vienetus (IU/ml). Kai tiriamo serumo duomenys buvo didesni už 200 IU/ml, reakcija buvo teigiama.

Pro-/antioksidacinės sistemos rodiklių tyrimai atlikti 31 Vilniaus miesto ilgaamžiui (9 vyrams ir 22 moterims). Tiriamųjų amžiaus vidurkis – 92±2,1 metų. Kontrolinę grupę sudarė 10 vidutinio amžiaus (45–65 m.) asmenų, kurių amžiaus vidurkis buvo 56,4±8,98 metų.

MDA kiekiui kraujo serume nustatyti naudota reakcija su tiobarbitūro rūgštimi, sudarant spalvotą kompleksinį junginį. Šio junginio absorbcija matuojama spektrofotometru (Marcel-PRO), kai bangos ilgis 530 nm ir 580 nm. MDA koncentracija skaičiuojama regresinės analizės būdu [11].

SOD aktyvumas eritrocituose nustatytas kolorimetriiniu metodu naudojant anglų firmos „Randox Laboratories Ltd.“ rinkinį „Ransod“. Iš ksantino ksantinoksidazinėje reakcijoje susidaro ir superoksido radikalas, kuris reaguoja su 2-(4-jodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazolio chloridu, sudarydamas rausvą formazano junginį, kurio absorbcija matuojama 505 nm bangos ilgiu. SOD aktyvumas nustatytas pagal aprašytos reakcijos slopinimo laipsnį ir išreiškiamas U/gHb.

GPO aktyvumas nustatytas heparinizuotame kraujyje, naudojant anglų firmos „Randox Laboratories Ltd.“ rinkinį „Ransel“. Metodas pagrįstas gliutaciono oksidacija kume-

no hidroperoksidu. Dalyvaujant gliutationo reduktazei ir NADPH, oksiduotas gliutationas paverčiamas redukuotu. Absorbicija matuojama 340 nm bangos ilgiu. GPO aktyvumas išreiškiamas U/gHb.

Tyrimų rezultatai apdoroti statistiškai, naudojant kompiuterinę statistinę programą „Statistic for Windows“.

## Rezultatai

Vilniaus miesto ilgaamžių ir pagyvenusių asmenų imunologinių rodiklių palyginamieji duomenys pateikti 1 lentelėje. Kaip matyti lentelėje, AK prieš ds-DNR buvo rasti tik 7 iš 47 ilgaamžių, t. y. 14,9%. Panašūs buvo ir pagyvenusių asmenų (kontrolinės grupės) rezultatai: čia teigiamų reakcijų buvo 3 iš 22 (13,6%). Ilgaamžių ir pagyvenusių žmonių neigiamų reakcijų skaičius (%) statistiškai patikimai taip pat nesiskyrė. Limfocitų blastogeninio atsako į FHA tyrimai išryškino jo skirtumus ilgaamžių ir pagyvenusių asmenų grupėse. Kaip matyti 1 lentelėje, limfocitų atsakas į nespecifinį mitogeną (FHA) ilgaamžių grupėje buvo aptiktas sumažėjęs 35 (74,5%), o tarp pagyvenusių žmonių tik 5 (22,7%) asmenims. Tik ketvirtadalis (25,5%) ilgaamžių limfocitų blastogeninis atsakas į FHA buvo normalus. Toks ryškus limfocitų atsako į FHA sumažėjimas ilgaamžių grupėje liudija susilpnėjusią jų limfocitų funkciją.

Kraujo MDA koncentracijos ir antioksidacinių fermentų SOD ir GPO aktyvumo tyrimų rezultatai pateikti 2 lentelėje. Kaip matyti 2 lentelėje, MDA koncentracija ilgaamžių kraujo serume buvo ryškiai padidėjusi ir

36% viršijo kontrolinės grupės MDA koncentraciją ( $p < 0,001$ ). Ilgaamžių ir kontrolinės grupės antioksidacinių fermentų aktyvumas taip pat ryškiai skyrėsi. SOD aktyvumas ilgaamžių eritrocituose buvo beveik du kartus (1,77 karto) mažesnis už kontrolinės grupės SOD aktyvumą ( $p < 0,001$ ). Dar ryškesnis, nei SOD, buvo GPO aktyvumo sumažėjimas ilgaamžių kraujyje, t. y. jis buvo beveik tris kartus (2,89 karto) mažesnis už kontrolinės grupės šio fermento aktyvumą ( $p < 0,001$ ).

## Rezultatų aptarimas

Pripažįstant svarbų imuninės sistemos vaidmenį sensant, pabrėžiama T ląstelių funkcijos pakitimų ir suintensyvėjusių autoimuninių reakcijų svarba [1–3]. Mūsų nustatytas ilgaamžių periferinio kraujo limfocitų atsako (blasttransformacijos) į nespecifinį mitogeną FHA sumažėjimas liudija šių ląstelių funkcinio aktyvumo sumažėjimą. Pažymėtina, kad limfocitų blasttransformaciją kai kurie autoriai įvardija ne tik ląstelių funkcinio aktyvumo, bet ir biologinio amžiaus žymeniu [12]. Nustatant AK prieš ds-DNR, ilgaamžių ir pagyvenusių žmonių grupių reakcijos intensyvumas beveik nesiskyrė. Tam įtakos galėjo turėti panaši tirtųjų asmenų sveikatos būklė. Nustatyta glaudi tiesioginė imunologinių rodiklių ir sveikatos būklės koreliacija senstant [2].

Nustatytas MDA kiekio padidėjimas ilgaamžių kraujo serume sutampa su kitų autorių [6–8] duomenimis ir patvirtina nuomonę, kad tai yra vykstančių intensyvių oksidacijos procesų rezultatas. MDA ne tik rodo membranų

1 lentelė. Vilniaus miesto ilgaamžių ir pagyvenusių asmenų (kontrolinė grupė) imunologinių rodiklių palyginamieji duomenys

| Rodiklis               | Ilgaamžiai (n = 47) |          | Pagyvenę (n = 22) |          | t      | p      |
|------------------------|---------------------|----------|-------------------|----------|--------|--------|
|                        | abs. sk.            | %        | abs. sk.          | %        |        |        |
| AK ds-DNR <sup>x</sup> |                     |          |                   |          |        |        |
| • reakcija neigiama    | 33                  | 70,2±6,7 | 19                | 86,4±7,5 | 1,6103 | >0,05  |
| • reakcija abejotina   | 7                   | 14,9±5,2 | -                 | -        | -      | -      |
| • reakcija teigiama    | 7                   | 14,9±5,2 | 3                 | 13,6±7,5 | 1,6108 | >0,05  |
| LBTF <sup>xx</sup>     |                     |          |                   |          |        |        |
| • normalus             | 12                  | 25,5±6,4 | 17                | 77,3±9,1 | 4,6561 | <0,001 |
| • sumažėjęs            | 35                  | 74,5±6,4 | 5                 | 22,7±9,1 | 4,6561 | <0,001 |

<sup>x</sup> Antikūnai prieš natyvinę dezoksiribonukleino rūgštį.

<sup>xx</sup> Limfocitų blastogeninis atsakas į fitohemaglutiną.

2 lentelė. Vilniaus miesto ilgaamžių ir vidutinio amžiaus asmenų (kontrolinė grupė) pro-/antioksidacinės sistemos rodiklių palyginamieji duomenys

| Tiriamųjų grupė           | MDA (nmol/ml) | SOD (U/gHb)    | GPO (U/gHb) |
|---------------------------|---------------|----------------|-------------|
| Ilgaamžiai (n = 31)       | 5,74±0,94     | 748,7±253,9    | 20,54±8,39  |
| Kontrolinė grupė (n = 10) | 3,68±0,57     | 1321,90±194,67 | 59,32±17,27 |

peroksidacijos laipsnį, bet ir yra audinių pažeidimo ir oksidacinio streso žymuo [9].

Oksidacijos ir peroksidacijos procesų suintensyvėjimą ilgaamžių grupėje liudija ir mūsų nustatytas apsauginių antioksidacinių fermentų SOD ir GPO aktyvumo sumažėjimas. Panašius nuo amžiaus priklausančius antioksidacinių fermentų aktyvumo pakitimus nustatė ir kiti autoriai [7, 10, 12]. Dėl nepakankamo SOD ir GPO aktyvumo sutrinka ir sulėtėja LR nuklenksminimas ir susidaro jų perteklius. Kai nėra pusiausvyros tarp susidarančių LR ir antioksidacinės ginamosios sistemos, pasireiškia oksidacinis stresas. Mūsų nustatytas ryškus MDA kiekio padidėjimas bei SOD ir GPO aktyvumo sumažėjimas ilgaamžių grupėje liudija oksidacinį stresą. Šią būseną koreguoti ir pagerinti kai kurie autoriai [13, 14] siūlo stiprinant antioksidantinę gynybą E ir C vitaminų papildais.

### Išvados

Tirtųjų Vilniaus miesto ilgaamžių limfocitų funkcija buvo susilpnėjusi. Ilgaamžių pro-/antioksidacinės sistemos rodiklių tyrimas parodė, kad intensyvių oksidacijos procesų nekompensavo fermentinės ginamosios sistemos ir pasireiškė oksidacinis stresas.

### Literatūra

1. Pawelec G, Barnett Y, Forsey R et al. T cells and aging. *Front Biosci.* 2002; 7: 1056–183.
2. Aspal R. Longevity and the immune response. *Biogerontology.* 2000; 1: 273–8.
3. Troen BR. The biology of aging. *Mt. Sinai J Med.* 2003; 70: 3–22.
4. Kasapoglu M, Ozben T. Alterations of antioxidant enzymes and oxidative stress markers in aging. *Exp Gerontol.* 2001; 36: 209–20.
5. Mecocci P, Polidori MC, Troiano L et al. Plasma

antioxidants and longevity: a study on healthy centerians. *Free Radic Biol Med.* 2000; 28: 1243–8.

6. Rikans LE, Hornbrook KR. Lipid peroxidation, antioxidant protection and aging. *Biochim Biophys Acta.* 1997; 1362: 116–27.

7. Inal ME, Kanbak G, Sunal E. Antioxidant enzyme activities and malondialdehyde levels related to aging. *Clin Chim Acta.* 2001; 305: 75–80.

8. Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993; 90: 7915–22.

9. Nielsen F, Mikkelsen BB, Nielsen JB et al. Plasma malondialdehyde as biomarker for oxidative stress: reference interval and effects of life-style factors. *Clin Chem.* 1997; 43: 1209–14.

10. Congy F, Bonnefont-Rousselot D, Dever S et al. Study of oxidative stress in the elderly. *Presse Med.* 1995; 24: 1115–8.

11. Gavrilov VB, Gavrilova AR, Mazhul LM. Analysis of the procedures for estimation of lipid peroxidation products using thiobarbituric acid test. *Vop Med Chim.* 1987; 1: 118–22.

12. Pansarasa O, Bertorelli L, Vecchiet J et al. Age-dependent changes of antioxidant activities and markers of free radical damage in human skeletal muscle. *Free Radic Biol Med.* 1999; 27: 617–22.

13. Miquel J. Nutrition and ageing. *Public Health Nutrition.* 2001; 4: 1385–88.

14. De la Fuente M. Role of antioxidants in the nutrition of the elderly. *Rev Esp Geriatr Gerontol.* 2000; 35: 61–71.

*Straipsnis įteiktas redakcijai 2006 m. birželio 16 d., parengtas spaudai 2006 m. rugsėjo 11 d.*

## INVESTIGATION OF THE IMMUNOLOGICAL AND OXIDATIVE STRESS INDICES IN VILNIUS OLDEST-OLD

E. Redaitienė, B. Butkienė, D. Vipartienė, R. Filipavičiūtė, B. Gaigalienė, V. Alekna

Institute of Experimental and Clinical Medicine at Vilnius University

### Summary

The aim of this study was to determine some immuno-

logical indices (antibodies against native DNA (anti-DNA), peripheral blood lymphocyte blasttransformation *in vitro*) and the oxidant / antioxidant status in the blood of the oldest old living in Vilnius.

*Methods.* Study group: 70 persons aged 90 years and older (mean age  $92 \pm 2.1$ ). Control group: 20 persons aged 60–70 years. Anti-DNA were determined by the ELISA method using the INOVA diagnostics, Inc. San Diego, CA 92131 kits. For the reaction of lymphocyte blasttransformation *in vitro* the mitogene

phytohemaglutinine was used.

Malondialdehyde (MDA) concentration in serum was determined spectrophotometrically by the thiobarbituric acid reaction. Superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px) activity was determined using Ransod and Ransel kits (Ranox Laboratories Ltd, UK) and following the manufacturer's instructions.

The results were statistically analysed using the Statistic for Windows program.

*Results.* The main finding of the study was that the oldest old had a significantly lower functional activity of lymphocytes, a higher concentration of MDA and decreased activities of SOD

and GSH-Px as compared to the control group.

*Conclusions.* The functional activity of peripheral blood lymphocytes in the oldest old is decreased. The data obtained suggest that the oxidative stress occurs in the oldest old because of excessive lipid peroxidation (as shown by the high level of MDA) and diminished activities of antioxidant enzymes (SOD and GSH-Px).

**Keywords:**

oldest old, immunological indices, malondialdehyde, superoxide dismutase, glutathione peroxidase