

ВЛИЯНИЕ ЛЕКТИНА БАЦИЛЛ НА НЕКОТОРЫЕ БИОХИМИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ КРОВИ САМЦОВ КРЫС ПРИ СТРЕССИРОВАНИИ ПЛАВАНИЕМ

© 2010 Л.В. Карпунина¹, Т.П. Кикалова¹, М.Д. Сметанина²

¹Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова, г. Саратов

²Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского, г. Саратов

Поступила 21.04.2009

Показано, что бактериальный лектин ЛП *Paenibacillus polymyxa* 1460 влияет на активность глутатион-S-трансферазы, аспаргат- и аланинаминотрансферазы, а также на содержание мочевины, холестерина, церулоплазмينا и глюкозы в крови самцов крыс, нормализуя некоторые из этих биохимических параметров при стрессировании плаванием.

Ключевые слова: бактериальные лектины, бациллы, биохимические параметры крови, животные, стресс.

Бактериальные лектины, представляющие собой соединения белковой природы и проявляющие специфическую и обратимую углеводсвязывающую активность, все шире находят применение в различных медико-биологических исследованиях. Научный и практический интерес к ним обусловлен тем, что многие из них обладают противомикробной, противовирусной и иммуномодулирующей активностью [1, 2].

Одной из серьезных проблем в настоящее время является изучение воздействия на живые организмы различных стрессоров, таких как эмоциональное напряжение, социальные потрясения, болевые раздражения, перегревание, воздействие холода и т.д. Физиологические изменения, которые происходят в организме при стрессах, изучены недостаточно. Однако установлено, что одним из наиболее эффективных способов повышения резистентности организма к различным видам стрессов является применение биологически активных веществ [3], к которым относят и бактериальные лектины.

Работ по влиянию лектинов непатогенных бактерий на метаболизм животного организма не так много [4, 5], и потому исследования воздействия лектина бактериального происхождения на биохимические параметры животных, как в норме, так и при некоторых нарушениях, являются актуальной задачей.

Исходя из всего сказанного, представляет значительный интерес изучение влияния лектинов бактерий и, в частности, лектина ЛП *P.*

polymyxa 1460 на некоторые биохимические параметры крови животных в условиях стрессирования плаванием.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводили на здоровых самцах белых беспородных крыс со средней массой 210 г. Во всех опытных группах использовали лектин ЛП, выделенный с поверхности почвенных азотфиксирующих бактерий рода *Paenibacillus polymyxa* 1460 по методу [6]. Препарат лектина вводили в концентрации 4 мкг в 0,5 мл 0,9% NaCl на животное интраперитонеально за час до стрессирования. В качестве стрессирующей процедуры применяли тест принудительного неизбежного плавания («forced swimming») в воде при температуре 25°C, регистрируя время плавания животных. По характеру воздействия экспериментальные животные были разделены на 4 группы: 1 группа – интактные животные; 2 группа получала инъекцию раствора лектина ЛП; 3 группу – подвергали стрессированию плаванием; 4 группу – после инъекции лектина ЛП подвергали стрессированию плаванием.

Активность глутатион-S-трансферазы (GST) определяли в эритроцитах крови животных [7]. Для определения активности аспаргат- (АСТ) и аланинаминотрансферазы (АЛТ) в сыворотке крови применяли набор реагентов для определения активности АСТ и АЛТ «Lachema» (Чешская республика) [8]. Определение содержания мочевины и холестерина в сыворотке крови осуществляли с помощью набора реактивов фирмы «Агат» (г. Москва) и «Диахим» (г. Дзержинск). Концентрацию церулоплазмينا (ЦП) и глюкозы в сыворотке крови определяли по методу Н.А. Ravin [9] и с использованием набора реагентов «Глюкоза-ФКД» (г. Москва) соответственно.

Результаты экспериментов подвергали статистической обработке по общепринятым методам с использованием t-критерия Стьюдента [10].

Карпунина Лидия Владимировна, доктор биологических наук, профессор кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии; Кикалова Татьяна Петровна, аспирант той же кафедры, e-mail: t_kikalova@bk.ru. Сметанина Мария Даниловна, кандидат биологических наук, доцент кафедры физиология человека и животных e-mail: pha@ Rambler.ru.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенных исследований было обнаружено, что время плавания животных с предварительно, введенным лектином *Бацилла* оказалось в 2 раза больше, чем контрольных и составило 83 мин. Мы предположили, что это может быть связано с активацией каких-либо процессов метаболизма в организме опытных животных после инъекции биологически активного препарата – лектина ЛП. Поэтому следующим этапом нашего исследования явилось определение активности некоторых ферментов (GST, АЛТ, АСТ), а также содержания ЦП, холестерина, мочевины и глюкозы в сыворотке и в крови экспериментальных животных.

Мультифункциональные белки глутатион-S-трансфераз являются универсальным дезинтоксикационным ферментом и осуществляют метаболическую защиту организма, как от экзогенных, так и от эндогенных токсических метаболитов [11]. Было показано, что введение экс-

периментальным животным бактериального лектина ЛП само по себе снижало активность GST на 25%, при этом стрессирование плаванием также достоверно снижало активность фермента GST в эритроцитах крови крыс на 58% – до 9,19 мкмоль/мин·л относительно интактных животных, активность фермента которых составила 19,90 мкмоль/мин·л. При предварительном введении бактериального лектина ЛП ферментативная активность GST эритроцитов крови крыс повышалась относительно группы плавания на 48% (до 18,79 мкмоль/мин·л) и приближалась к норме, то есть к значениям активности фермента животных интактной группы (19,90 мкмоль/мин·л) (табл. 1).

Таким образом, приведенные экспериментальные данные, позволяют говорить о том, что лектин *Бацилла* ЛП, вводимый в организм крыс перед действием стрессового фактора, оказывает нормализующее воздействие на активность GST в организме крыс.

Таблица 1. Влияние лектина ЛП на время плавания и активность ферментов и содержание церулоплазмينا в норме и при стрессе

Характер воздействия	GST, мкмоль/мин·л	АЛТ, мкмоль/мин·л	АСТ, мкмоль/мин·л	Коэф-т Де Ритиса	ЦП, мг/л
Интактные животные	19,90±0,63	1,73±0,02	1,99±0,02	1,15±0,01	595,90±5,02
Лектин ЛП	15,12±0,42*	0,82±0,02*	2,12±0,09*	2,58±0,11*	469,80 ± 5,87*
Плавание	9,19±1,70* °	2,39±0,13*	3,34±0,03*	1,38±0,01*	739,87±1,28*
Лектин ЛП + плавание	18,79±0,41 ^Δ	1,57±0,09 ^Δ °	1,23±0,06* ^Δ °	0,78±0,04* ^Δ °	727,71±5,23* °

Примечание. * – $p < 0,05$ относительно значений животных интактной группы; ^Δ – $p < 0,05$ относительно значений группы животных после стрессирования плаванием; ° – $p < 0,05$ относительно значений животных с инъекцией лектина ЛП.

В ходе дальнейших экспериментов было показано, что введение крысам лектина ЛП без воздействия стрессора, понижало активность АЛТ на 50%, в то время как воздействие стрессового фактора в виде принудительного плавания повышало активность этого фермента в сыворотке крови крыс на 40%, которая составила 2,39 мкмоль/мин·л относительно 1,73 мкмоль/мин·л у интактных животных, как это было показано в табл. 1. Уровень активности АСТ достоверно не изменялся относительно контрольных значений. При стрессировании животных плаванием активность АСТ повышалась относительно исходных значений на 70% и составляла 3,34 мкмоль/мин·л против 1,99 мкмоль/мин·л у группы интактных животных. Коэффициент Де Ритиса в группе животных с инъекцией лектина ЛП и в группе плавания повышался относительно контрольных значений, что говорит об увеличении синтеза АСТ митохондриями. Из литературных данных

известно, что при различных стрессорных и патологических состояниях в организме животных изменяется способность клеток вырабатывать аминотрансферазы [12].

При предварительном введении крысам лектина ЛП было отмечено снижение активности АСТ более чем в 2 раза относительно животных, стрессированных плаванием. Также происходило снижение уровня активности АСТ на 40% относительно интактных животных. При этом активность АЛТ достоверно снижалась относительно животных группы плавания. Значение коэффициента Де Ритиса в группе животных, подвергнутых стрессу при предварительном введении лектина ЛП, понижалось относительно всех экспериментальных групп. Можно предположить, что это явилось следствием затрудненного выхода АЛТ и АСТ из клеток в кровяное русло. Причиной этого может быть стабилизация структуры мембран клеток под влиянием бактериального лектина

ЛШ, либо ингибирование синтеза этих ферментов лектином ЛШ.

Далее нами было рассмотрено влияние лектина ЛШ и стресса в виде принудительного плавания на содержание церулоплазмينا. Показано, что у интактных животных содержание ЦП в сыворотке крови составило 595,9 мг/л (табл. 1). Введение биологически активного вещества лектина ЛШ понижало активность данного фермента. Стрессирование плаванием вызывало увеличение содержания ЦП в сыворотке крови крыс на 24% и составило 739,87 мг/л против 595,90 мг/л в контроле. Предварительное введение лектина ЛШ не повлияло на содержание ЦП.

Известно, что основная физиологическая роль церулоплазмينا определяется его участием в окислительно-восстановительных реакциях, а именно в острофазовом ответе, инактивируя свободные радикалы – высокореактивные химические агенты с неспаренными электронами, образующиеся из кислорода и способные вызывать повреждение ткани. Концентрация ЦП в крови повышается при острых воспалительных процессах, инфаркте миокарда, ишемии и других заболеваниях, связанных с повреждением тканей [13]. Поэтому повышение его уровня в крови в данном случае рассматривается нами как компенсаторная реакция организма, направленная на ферментативное окисление биогенных аминов и других медиаторов.

При изучении азотистого и липидного об-

менов, было обнаружено, что содержание мочевины в сыворотке крови животных достоверно увеличивалось при стрессировании плаванием в 2,5 и составило 8,74 ммоль/л против 3,76 ммоль/л в контроле (табл. 2). Полученные нами данные подтверждаются литературными источниками, согласно которым уровень мочевины повышается после физических нагрузок [14].

Введение в организм крыс лектина ЛШ не влияло на уровень мочевины и холестерина в сыворотке крови экспериментальных животных. Однако уровень холестерина в сыворотке крови животных, подвергшихся стрессированию, повышался до 6,54 ммоль/л против 1,03 ммоль/л в контроле, что оказалось в 6,5 раз выше нормы (значений интактных животных). Повышение концентрации холестерина в сыворотке крови крыс может быть следствием увеличения активности синтеза общего холестерина печенью и повышенного расходования его на уплотнение клеточных мембран, проницаемость которых нарушается под действием продуктов перекисного окисления липидов во время стресса.

Предварительное введение бактериального лектина вызывало снижение уровня мочевины у животных после плавания контрольной группы животных, в то время как содержание холестерина в сыворотке крови крыс оставалось повышенным.

Таблица 2. Влияние лектина ЛШ на концентрацию мочевины, холестерина и глюкозы в сыворотке крови крыс в норме и при стрессе

Характер воздействия	Мочевина, ммоль/л	Холестерин, ммоль/л	Глюкоза, ммоль/л
	(M ± m)		
Интактные животные	3,76±0,19	1,03±0,13	7,18±0,65
Лектин ЛШ	3,46 ± 0,31	1,42 ± 0,12	9,64±1,04
Плавание	8,74±0,21*	6,54±0,37*	18,22±1,55*
Лектин ЛШ + плавание	7,65±0,30* ^Δ €	6,35±0,31* €	18,24±2,15* €

Примечание. Обозначения см. в табл. 1.

При исследовании концентрации глюкозы в сыворотке крови опытной группы животных с введенным препаратом лектина ЛШ показано, что количество данного углевода достоверно не отличалось от значений интактной группы животных. Результаты наших исследований согласуются с литературными данными [15]. Содержание глюкозы у животных группы плавания оказалось в 2,5 раза больше, чем в группе интактных животных (табл. 2). При этом содержание глюкозы в группе плавания с предварительным введением лектина ЛШ не отличалось от показателей группы плавания.

Таким образом, представленные исследования свидетельствуют о том, что лектин бацилл ЛШ *P. polymyxa* 1460 оказывает влияние на ме-

таболизм животного организма, регулируя активность АСТ и АЛТ, содержание холестерина и церулоплазмينا в условиях стрессовых воздействий, приводя показатели активности некоторых важных биохимических показателей к норме. Тем самым лектин бацилл ЛШ мобилизует метаболизм, способствуя быстрой адаптации организма к различным неблагоприятным воздействиям. Возможно, такая регулирующая физиологическая функция бактериального лектина бацилл объясняется его протекторным действием на мембраны клеток. Важно отметить, что лектин ЛШ *P. polymyxa* 1460 обладает сходным действием на различные биохимические параметры крови животных в условиях различных видов стресса (холодовой, этано-

вый стрессы, иммобилизация, принудительное плавание), что говорит о его широком спектре действия [16, 17].

Полученные результаты вносят существенный вклад в понимание природы и свойств биологически активных соединений – лектинов, расширяют наши представления о влиянии лектинов бактериального происхождения на метаболизм животного организма и их регуляторную роль.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Карпунина Л.В. и др. Изучение бактерицидных и фунгицидных свойств белков агглютининов (лектинов) почвенных азотфиксирующих бактерий // Биотехнология. 1997. Т. 3. С. 10-13.
2. Пономарева Е.Г. и др. Иммуномодулирующие свойства лектина *Azospirillum brasilense* Sp7 // Міжнародна Наукова конференція Odesa, 2006. С. 148.
3. Франц Х. Лектины: свойства, функции и возможности применения // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 1996. № 3. С. 3-6.
4. Кикалова Т.П. и др. Определение активности глутатион-S-трансферазы эритроцитов крови самцов крыс в условиях кратковременного и продолжительного холодого стресса на фоне введения лектинов бацилл // Современные наукоемкие технологии. 2008. № 1. С. 93.
5. Неверова Н.Н. и др. Влияние лектина *Paenibacillus polymyxa* на активность глутатион-S-трансферазы в крови крыс при стрессе // Вестник Оренбургского гос. ун-та. 2008. № 80. С. 117-120.
6. Карпунина Л.В. Роль агглютинирующих белков азотфиксирующих бацилл и ризобий в жизнедеятельности бактерий и при взаимодействии с растениями: Дис...док. биол. наук. Саратов, 2002. 315 с.
7. Habig W.H., Jacoby W.B Assays for differentiation of glutathione-S-transferases // Methods in Enzymol. 1981. V. 77. P. 398-402.
8. Reitman, S., Frankel S. A calorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases // Amer.J.Clin.Pathol. 1957. V. 28. P. 56.
9. Ravin H.A. An improved colorimetric enzymatic assay of ceruloplasmin // J. Lab. Clin. Med. 1961. V. 7, N 2. P. 161-168.
10. Зайцев Т.Н. Математический анализ биологических данных. М.: Наука, 1991. 268 с.
11. Limdi, J.K., Hyde G.M. Evaluation of abnormal liver function tests // Postgrad. Med. J. 2003. V. 79. P. 307-312.
12. Jung K., Pergande M., Rej R. Mitochondrial Enzymes in Human Serum: Comparative Determinations of Glutamate Dehydrogenase and Mitochondrial Aspartate Aminotransferase in Healthy Persons and Patients with Chronic Liver Diseases // Clin. Chem. 1985. V. 31. P. 239-243.
13. Емельянов Д.Н. и др. Влияние внутреннего лазерного облучения крови на общую активность церулоплазмина у больных хроническими дисфузными заболеваниями печени // Гепатология. 2004. № 3. С. 37-39.
14. Ленкова Р.И. Изменение содержания мочевины в крови и тканях при мышечной деятельности в зависимости от адаптированности организма // Физиологический журнал СССР им. Сеченева. 1973. Т. 59, №7. С. 1097-1107.
15. Гаврилова, М.Г., Сметанина М.Д., Карпунина Л.В. Инсулиноподобный эффект лектина *Bacillus pumilus* у самок крыс с экспериментальным гипотиреозом // Материалы II конгресса молодых ученых и специалистов «Науки о человеке» Томск, 2001. С. 48-49.
16. Неверова Н.Н. и др. Влияние лектина на активность глутатион-S-трансферазы эритроцитов крови самцов крыс в условиях этанолового стресса // Современные наукоемкие технологии. 2007. № 5. С. 73.
17. Неверова Н.Н. и др. Изменение активности глутатион-S-трансферазы и церулоплазмина в крови крыс при стрессе на фоне введения лектина *Paenibacillus polymyxa*// Стратегия взаимодействия микроорганизмов и растений с окружающей средой: Тез. третьей межрегиональной конференции молодых ученых, Саратов, 10-12 октября, 2006. С. 33.

INFLUENCE OF BACILLUS LECTIN ON SOME BIOCHEMICAL PARAMETERS OF BLOOD OF MALE RATS IN CONDITIONS OF SWIMMING STRESS

© 2010 L.V. Karpunina¹, T.P. Kikalova¹, M.D. Smetanina²

¹ Saratov state agrarian university name of N.I. Vavilov

² Saratov state university name of N.G. Chernishevsky

The bacterial lectin LII *Paenibacillus polymyxa* 1460 is shown to affect activity of glutathione-S-transferase, aspartate aminotransferase and alanin aminotransferase, as well as the content of urea, cholesterol and concentrations of ceruloplasmin and glucose in the blood of male rats, normalizing some of these biochemical parameters in combination with swimming stress.

Key words: bacterial lectin, bacillus, blood biochemical parameters, animals, stress.

Karpunina Lidiya Vladimirovna, Doctor of Biology, professor of chair of microbiology, virusology, immunology; *Kikalova Tat'yana Petrovna*, post-graduate student of the chair, t_kikalova@bk.ru. *Smetanina Mariya Danilovna*, candidate of Biology, reader of chair of human and animal physiology pha@rambler.ru.