

Неверова Н.Н.*, Кикалова Т.П.*, Сметанина М.Д.***, Карпунина Л.В.*

*Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова, Россия

**Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского, Россия

ВЛИЯНИЕ ЛЕКТИНА *PAENIBACILLUS POLYMUХА* НА АКТИВНОСТЬ ГЛУТАТИОН-S-ТРАНСФЕРАЗЫ В КРОВИ КРЫС ПРИ СТРЕССЕ

Изучено влияние лектина ЛIII, выделенного с поверхности *Paenibacillus polymyxa* 1460, на активность глутатион-S-трансферазы эритроцитов крови крыс в условиях кратковременного и продолжительного голодового и иммобилизационного стрессов. Показано, что лектин благоприятно воздействует на организм животных, приводя активность фермента к норме при различных видах стресса.

Ключевые слова: бактериальные лектины, *Paenibacillus polymyxa*, ферменты, глутатион-S-трансфераза, стресс.

Введение

Публикации последних лет свидетельствуют, что лектины, и, в частности, бактериальные лектины, оказывают существенное влияние на метаболизм животной клетки, обладая иммуномодулирующим, противоопухолевым, митогенным, инсулиноподобным действием [21, 15, 2, 16, 7]. Имеются сведения о влиянии бактериальных лектинов на активность различных ферментов [25, 20, 10, 24]. Ранее было показано, что введение лектина ЛIII *Paenibacillus polymyxa* 1460 в организм крыс, находящихся в условиях стресса, приводило к изменению активности ряда ферментов: увеличению кислых гидролаз, пероксидазы, снижению аминотрансфераз сыворотки крови [12, 13]. Одной из серьезных проблем в современном мире является изучение реакции живого организма на различные стрессы. Причиной стрессов могут являться самые разнообразные факторы: эмоциональное напряжение, социальные потрясения, болевые раздражения, перегревание, переохлаждение, воздействие холода и т.д. [18, 19]. Физиологические изменения, которые происходят в организме при стрессах, недостаточно хорошо изучены к настоящему времени. Известно, что в формировании устойчивости организма к различным стрессорным воздействиям (химическим и физическим) уникальную роль играет система глутатиона, важным компонентом которой являются мультифункциональные белки - глутатион-S-трансферазы, сосредоточенные, главным образом, в цитозоле клеток всех тканей, а некоторые из них - в микросомах и внешней мембране митохондрий. Яв-

ляясь универсальным дезинтоксикационным ферментом, глутатион-S-трансфераза осуществляет метаболическую защиту организма, как от экзогенных токсических веществ, так и от эндогенных токсических метаболитов [9, 17]. Среди различных стрессов - большой интерес среди исследователей, вызывает изучение влияния голодового и иммобилизационного стрессов на живые организмы [1, 14]. Установлено, что одним из наиболее эффективных способов повышения резистентности организма к различным видам стрессов является применение биологически активных веществ [3], к которым относят и лектины.

Исходя из этого интересно было изучить влияние лектина *Paenibacillus polymyxa* 1460 на активность глутатион-S-трансферазы эритроцитов крови крыс в условиях голодового и иммобилизационного стрессов, что и явилось целью настоящей работы.

Материалы и методы

В работе использовали лектин ЛIII, который выделяли с поверхности почвенных азотфиксирующих *Paenibacillus polymyxa* 1460 по методу, описанному нами ранее [6]. Выход белка лектина ЛIII регистрировали на приборе Uvicord S-II (LKB) и спектрофотометре СФ-2000 при 278 нм. Культура *Paenibacillus polymyxa* 1460 была получена из Чешской коллекции микроорганизмов (ССМ).

Исследования выполняли на белых беспородных крысах самцах. Животных содержали в стандартных условиях вивария. Стресс моделировали путем помещения крыс на лед на 10 минут (голодовой стресс) и фиксации животных на спине в течение 10 минут (им-

мобилизационный стресс). Препарат лектина ЛШ вводили интраперитонеально в дозе 2 мкг/животное. По характеру воздействия животные были поделены на 8 групп: 1 группа – контрольные животные, получавшие 0,5 мл физиологического раствора; 2 группа – животные получали инъекцию раствора ЛШ; 3 группа – животных подвергали воздействию холодового стресса в течение 10 минут; 4 группа – животных подвергали иммобилизационному стрессу в течение 10 минут; 5 группа – животные получали инъекцию ЛШ, а затем через сутки использовали холодовой стресс 10 минут; 6 группа – животных подвергали иммобилизационному стрессу в течение 10 минут после введения ЛШ.

Активность глутатион-S-трансферазы определяли в гемолизате эритроцитов по методу [22]. Для этого к 100 мкл гемолизата эритроцитов добавляли 1,2 мл глутатиона (0,721 мкг/мл). Реакцию инициировали путем добавления 1,2 мл 2 мМ раствора 2,4-динитробензола. Активность фермента измеряли на спектрофотометре СФ-2000 при длине волны 340 нм и выражали в мкмоль/мин·л.

Результаты экспериментов подвергали статистической обработке по общепринятым методам с использованием t-критерия Стьюдента [4].

Результаты и обсуждение

В процессе исследований было показано, что при введении экспериментальным животным (крысам) лектина *P. polytuxa* 1460 ЛШ активность фермента глутатион-S-трансферазы понижалась до 15,10 мкмоль/мин·л по сравнению с контролем (19,90 мкмоль/мин·л), (таблица 1) что свидетельствовало по нашему мнению, о благоприятном его воздействии на организм, поскольку лектин ЛШ как было показано нами ранее, может изменять физико-химические свойства мембраны, и тем самым изменять ее функциональное состояние (Ильин и др., Доклады российской академии естественных наук, № 2, 2000), вследствие чего, возможно, снижается активность защитного цитозольного фермента клетки – глутатион-S-трансферазы.

Пребывание крыс на холоде в течение 10 минут, приводило к понижению активности

глутатион-S-трансферазы в их организме до 16,11 мкмоль/мин·л относительно интактных животных (19,90 мкмоль/мин·л). Такое уменьшение активности изучаемого фермента можно объяснить тем, что холодовой стресс, как известно из некоторых работ [8], замедляет процессы обмена веществ в организме и, тем самым, замедляет выделение токсинов. Зная, что глутатион-S-трансфераза обладает анти-токсичным действием [22], можно было предположить снижение активности глутатион-S-трансферазы в условиях холодового стресса относительно контроля, что и было подтверждено в наших экспериментах. Для дальнейших исследований было выбрано 10 минутное холодовое воздействие, поскольку, как видно из приведенных результатов, даже кратковременного холодового стресса достаточно было для изменения активности фермента.

При изучении иммобилизационного стресса на активность глутатион-S-трансферазы крыс было показано, что иммобилизация в течение 10 минут не вызывала существенных изменений в активности фермента. Активность фермента в опыте и контроле, как видно из таблицы 1, была практически одинакова.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что активность глутатион-S-трансферазы зависит от различных видов стрессового воздействия.

Для выяснения возможного влияния лектина ЛШ на активность глутатион-S-трансферазы крыс в условиях стресса, данный лектин интраперитонеально вводили в организм животным (крысам), а затем подвергали их стрессированию. Было показано, что холодовой стресс не вызывал

Таблица 1. Влияние лектина *P. polytuxa* 1460 и различных видов стресса на активность глутатион-S-трансферазы эритроцитов крови крыс

Характер воздействия	Активность фермента, мкмоль/мин л (M±m)
Контроль	19,90±0,63
ЛШ	15,10±0,40*
Иммобилизационный стресс (10 мин)	19,58±0,76
Холодовой стресс (10 мин)	16,11±0,86*

Обозначения: * – P<0,05 относительно контрольной группы.

Таблица 2. Влияние лектина бацилл на активность глутатион-S-трансферазы эритроцитов крови крыс в условиях стресса

Характер воздействия	Активность фермента, мкмоль/мин л (M±m)
Контроль	19,90 ± 0,63
ЛП	15,10 ± 0,40*
ЛП+иммобилизационный стресс (10 мин)	16,90 ± 0,76*°
ЛП+холодовой стресс (10 мин)	18,44 ± 1,51

Обозначения: * – P<0,05 относительно контрольной группы, ° – P<0,05 относительно иммобилизационного стресса.

характерных изменений в активности фермента относительно интактных животных (таблица 2). Вполне очевидно, что лектин ЛП *P. polymyxa* 1460 способствовал нормализации данного показателя крови. У животных, которым вводили ЛП, а затем подвергали иммобилизационному стрессу, происходило понижение активности фермента на 15 % (16,90 мкмоль/мин·л) по сравнению с показателями (таблица 2), которые были выявлены в контроле (19,90 мкмоль/мин·л) и при иммобилизационном стрессе (19,58 мкмоль/мин·л). То есть отмечали тот же эффект, который был замечен нами при воздействии только препарата ЛП.

О механизмах изменения активности ферментов при взаимодействии их с лектинами в литературе существует множество самых разных предположений [26, 23, 27, 20, 11]. Одним из путей изменения активности ферментов может являться изменение проницаемости клеточных мембран при стрессе. Вполне возможно, что лектин бацилл ЛП, обладая специфичностью к галактозамину, глюкуроновой кислоте, фруктозо-1,6-дифосфату, глюкозамину [6], может взаимодействовать со специфическими рецепторами клеточной мембраны, изменяя тем самым свойства и функциональное состояние клеток эритроцитов крови, как было показано нами ранее [5], что сказывается и на активности глутатион-S-трансферазы. Данное предположение нуждается в дальнейших экспериментах, однако результаты проведенных исследований позволяют говорить о благоприятном воздействии лектина бацилл (ЛП) на организм животных (крыс), о чем можно судить по нормализации активности глутатион-S-трансферазы при различных видах стресса. Возможно, что предварительное введение лектина животным мобилизует метаболизм и способствует быстрой адаптации организма при различных неблагоприятных воздействиях.

Список использованной литературы:

- Афанасьев С.А. Изменение электрофизиологических свойств микардиоцитов при остром холодовом воздействии / С.А. Афанасьев, Е.Д. Алексеева, И.Б. Бордамова // Бюлл. exper. биол. и мед. - 1994. - № 11. - С. 480-483.
- Гаврилова М.Г. Влияние лектина *Bacillus polymyxa* на содержание мочевины и глюкозы в крови самок белых крыс и мышей / М.Г. Гаврилова, М.Д. Сметанина, Л.В. Карпунина // Матер. III Всерос. научной конф. "Эколого-биологические проблемы Волжского региона и Северного Прикаспия", Астрахань, 2000. - С. 104-105.
- Душкин М.И. Влияние природных полифенольных соединений на окислительную модификацию липопротеинов низкой плотности / М.И. Душкин, А.А. Зыков, Е.Н. Пивоварова // Бюлл. exper. биол. и мед. -1993. - Т. 116, № 10. -С. 393-395.
- Зайцев Т.Н. Математический анализ биологических данных. М.: Наука, 1991. - 268 с.
- Ильин Д.А. Влияние лектина *Bacillus polymyxa* на некоторые показатели красной крови и структурно-функциональные свойства эритроцитов крыс / Д.А. Ильин, Л.В. Карпунина, К.А. Лямзаев, Г.В. Мельников, У.Ю. Мельникова, В.А. Самохвалов, М.Д. Сметанина // Доклады Российской академии естественных наук.-2000.-№ 2.-С.41-44.
- Карпунина Л.В. Лектины *Bacillus polymyxa*: локализация, участие во взаимодействии с корнями пшеницы / Л.В. Карпунина, О.А. Вишневецкая, В.Е. Никитина, У.Ю. Мельникова // Микробиология. -1993. - Т. 62, № 2.- С. 307-313.
- Карпунина Л.В. Лектины бацилл в изучении синтеза цитокинов при фагоцитозе некоторых энтеробактерий / Л.В. Карпунина, Е.И. Тихомирова, Е.А. Горельникова // Матер. междунар. конф. "Профилактика, диагностика и лечение инфекционных болезней, общих для людей и животных". Ульяновск, 2006. - С.100-102.
- Кошечев В.С. Физиология и гигиена индивидуальной защиты человека от холода. М.: Медицина, 1981. - 287 с.
- Кулинский В.И. Биологическая роль глутатиона / В.И. Кулинский, Л.С. Колесниченко // Успехи современной биологии. -1990. - Т. 110, № 1(4). - С.20-23.
- Лахтин В.М. Очистка ферментов с помощью лектинов / В.М. Лахтин // Биотехнология.- 1985.- № 5. - С. 11-27.
- Лахтин В.М. Биотехнология лектинов / В.М. Лахтин // Биотехнология. -1989. - Т. 5, № 6. - С. 676-691.
- Мухачева Е.С. Влияние лектина *Paenibacillus polymyxa* на некоторые метаболические процессы животных: Автореф. дис... канд. биол. наук. Саратов: Изд-во Саратовского ун-та, 2004. - 22 с.
- Неверова Н.Н. Влияние лектина *Paenibacillus polymyxa* на активность пероксидазы эритроцитов крови крыс в условиях иммобилизационного и окислительного стрессов / Н.Н. Неверова, Н.С. Сычевья, М.Д. Сметанина, Л.В. Карпунина // Матер. конф. "Вавиловские чтения-2006". Саратов, 2006. - С. 72-74.
- Подсеваткин В.Г. Влияние иммобилизационного и ультразвукового стрессов на некоторые иммунологические показатели белых мышей / В.Г. Подсеваткин, С.А. Аношкина, С.В. Кирюхина, Д.В. Подсеваткин // Тр. Мордовской республиканской клинической психиатрической больницы. Саранск, 2001. - Т. 20, Вып. 2. - С. 75-78.

15. Пономарева Е.Г. Биологическая активность бактерий рода *Azospirillum*: Автореф. дис... канд. биол. наук. Саратов: ИБФРМ РАН, 1997. - 16 с.
16. Пономарева Е.Г. Иммуномодулирующие свойства лектина *Azospirillum brasilense* Sp7 / Е.Г. Пономарева, В.Е. Никитина, Н.В. Емельянова, Н.Б. Захарова // Міжнародна Наукова конференція. Odesa, 2006. -С. 148.
17. Саприн А.Н. Процессы перекисного окисления в организме и природные антиоксиданты / А.Н. Саприн. // Успехи биологической химии. - 1991. - Т. 32. - С. 146-175.
18. Селье Г. Очерк адаптационного синдрома. М.: Медицина, 1960. - 254 с.
19. Федотов Б.М. Стресс, кардиологические аспекты / Б.М. Федотов // Физиология человека. - 1997. - Т. 2, № 4. - С. 89-99.
20. Gilboa-Garber N. Microbial lectin cofunction with lytic activities as a model for a general basis lectin role / N. Gilboa-Garber, N.Garber // FEMS Microbiol. Rev. - 1989. - V. 63. - P. 211-222.
21. Gilboa-Garber N. Possible of *Pseudomonas aeruginosa* lectins / N. Gilboa-Garber // Abstracts 8th Intern. Congress of bacteriology and applied Microbiology division. Ierusalim, Israel, 18-23, 1996. - P. 92.
22. Habig W.H. Assays for differentiation of glutathione-S-transferases / W.H. Ha-big, W.B. Jacoby. // Methods in Enzymol. - 1981. - V. 77. - P. 398-402.
23. Iwamori M., Shimomura J., Nagai Y. Specific binding of cholere toxin to rat erythrocytes revealed by analysis with a fluorescence-activated cell sorter / M. Iwamori, J. Shimomura, Y. Nagai // J. Biochem. -1985. -V. 97, № 3. -P. 729-735.
24. Karpunina L.V. Effect of agglutinins from *Rhizobium leguminosarum* strain 252 on the activity of hydrolytic enzymes / L.V. Karpunina, E.F. Soboleva, O.A. Pronina // Current Microbiol. - 2000. - V. 42. - P. 73-75.
25. Lorens-Kubis I. Effects of lectins on enzymatic properties plant acid phosphatases and ribonucleases / I. Lorens-Kubis, B. Morawiecka, E. Wiczorek, J. Wisniowska, E. Wierzba, M. Ferens, T.C. Bog-Hansen // Lectins: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry / Ed. T.C. Bog-Hansen.- Walter de Gruyter. Berlin, 1981. -V. 1. -P. 169-178.
26. Meflah K., Harb J., Duflos Y., Bernard S. 5'-nucleotidase from bovine caudate nuclens synaptic plasma a membranes: specificity for substrate and cations, study of the carbohydrate moiety by glycosidases // J. Neurochemistry. - 1984. - V. 42, № 4. - P. 1107-1115.
27. Tuomanen E. Characterization of two adhesions of *Bordetella pertussis* for human ciliated respiratory-epithelial cells / E. Tuomanen, A. Weiss // The J. of Infections Diseases. -1985. -V. 152, № 1. -P. 118-125.

Исследования выполнялись при частичной поддержке гранта CRDF(CR-006-x1).

Статья рекомендована к публикации 19.04.07