

## ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ДЕЛЬТА-ЭНДОТОКСИНА *BACILLUS THURINGIENSIS* НА АКТИВНОСТЬ ТРАНСАМИНАЗ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ И ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ ЖИЗНИ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

Терёхина Н.В.<sup>1</sup>, Каменек Л.К.<sup>1</sup>, Шроль О.Ю.<sup>1</sup>, Иванова Л.А.<sup>1</sup>, Андреева Т.С.<sup>1</sup>, Коршунова С.Н.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБОУ ВПО «Ульяновский государственный университет», Ульяновск, Россия, kelasueva@mail.ru

Дана оценка влияния дельта-эндотоксина *B. thuringiensis* на активность трансаминаз в сыворотке крови, продолжительность жизни и массу тела лабораторных животных. 40 беспородных белых крыс в возрасте 240 суток разделили на контрольную и три (I, II, III) опытные группы. Животным I, II и III опытных групп ежедневно в течение 3 месяцев перорально с пищей вводили раствор кристаллов дельта-эндотоксина *B. thuringiensis subsp. sotto* в концентрациях 4 мг/кг, 8 мг/кг и 16 мг/кг. Активность ЛДГ в сыворотке крови у животных I и II опытных групп составляет  $2887,5 \pm 197,72$  Ед/л и  $3550 \pm 158,11$  Ед/л, у животных контрольной группы -  $4740 \pm 304,76$  Ед/л, а у животных III опытной группы -  $4400 \pm 228,04$  Ед/л. Снижение активности данного фермента у животных I и II групп обусловлено усилением аэробности условий, которое было вызвано действием дельта-эндотоксина. Снижение активности АсАТ в сыворотке крови у животных опытных групп происходит в 2, 1,5 и 2,5 раза по сравнению с таковым показателем у животных контрольной группы. Это может свидетельствовать об уменьшении степени разрушения клеток с возрастом. В активности АлАТ не было отмечено достоверных отличий между животными экспериментальных групп. Продолжительность жизни животных III опытной группы на 4% превышает таковую животных контрольной и I, II опытных групп. Средняя масса животных I группы на 11%, II и III групп на 13% превышает массу животных контрольной группы. Сохранение массы тела у животных опытных групп мы склонны рассматривать как результат замедления развития атрофических процессов в мышечной ткани взрослых животных. Полученные результаты не выявили токсического воздействия (прямого) дельта-эндотоксина данного подвиды на млекопитающих.

Ключевые слова: дельта-эндотоксин, *Bacillus thuringiensis*, лактатдегидрогеназа, аспартатаминотрансфераза, аланинаминотрансфераза, продолжительность жизни, масса тела, пероральное введение, белые крысы.

## EVALUATION OF THE EFFECT OF DELTA-ENDOTOXIN OF *BACILLUS THURINGIENSIS* ON THE ACTIVITY OF TRANSAMINASES IN THE SERUM AND THE LIFESPAN OF LABORATORY ANIMALS

Terehina N.B.<sup>1</sup>, Kamenek L.K.<sup>1</sup>, Shroll O.Y.<sup>1</sup>, Ivanova L.A.<sup>1</sup>, Andreeva T.S.<sup>1</sup>, Korshunova S.N.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>«Ulyanovsk State University», Ulyanovsk, Russia, kelasueva@mail.ru

The influence of the delta-endotoxin of *B. thuringiensis* on the activity of transaminases in the blood serum lifetime and body weight of the laboratory animals. 40 white mongrel rats aged 240 days were divided into a control and three (I, II, III) experimental groups. Animals of I, II, and III test groups daily for 3 months orally with food is injected with a solution of crystal delta-endotoxin of *B. thuringiensis subsp. sotto* at a concentration of 4 mg/kg, 8 mg/kg and 16 mg/kg. Activity of LDG in serum of animals I and II of the experimental groups of  $2887,5 \pm 197,72$  U/L and  $3550 \pm 158,11$  U/L in the control group -  $4740 \pm 304,76$  U/L, and the animals experimental group III -  $4400 \pm 228,04$  U/L. The reduction in activity of this enzyme in the animal I and II of the test groups, probably due to increased aerobic conditions, which was caused by the action of delta-endotoxin. Decreased activity of AST in the blood serum of experimental animals occurs in 2, 1.5 and 2.5 times as compared with that in the control indicator groups. This may reflect, in our view, the reduction of the degree of destruction of cells with age. In ALT activity was not observed significant differences between animals of experimental groups. The duration of life of the animals of the experimental group III 4% higher than that of control animals, and I, II experimental groups. The average weight of animals in group I is 11%, II and III groups is 13% higher than the weight of the animals of the control group. Preservation of body weight in animals of the experimental groups, we tend to consider as a result of the slowdown in the development of atrophic processes in the muscle tissue of adult animals. The results showed no toxic effects (direct) delta-endotoxin of this subspecies in mammals.

Keywords: delta- endotoxin, *Bacillus thuringiensis*, lactate dehydrogenase, aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, longevity, body weight, orally administered, the white rat.

В связи с широким распространением и повсеместным использованием инсектицидов на основе энтомопатогенной бактерии *B. thuringiensis*, а также внедрением в производство растений, модифицированных геном токсинообразования, значительно возросла биодоступность токсина [7, 8]. Потребность в препаратах на основе споровокристаллических комплексов бактерии *B. thuringiensis* для защиты сельскохозяйственной продукции от разных вредителей увеличивается с каждым годом, так как они экологически наиболее безопасны и эффективны по сравнению с химическими методами [2, 3]. По оценке экспертов, генетически модифицированные источники содержат уже 80% овощных консервов, 70% мясных продуктов и кондитерских изделий, 50% фруктов и овощей, 20% молочных продуктов и 90% пищевых смесей для детей. Сегодня в мире 18 стран выращивают трансгенную продукцию. В России выращивание трансгенных культур официально запрещено, а импорт генно-модифицированных продуктов разрешен [1].

В связи с выше сказанным неизбежно попадание токсина в организм животных и человека. В настоящее время появляется все больше публикаций, особенно в зарубежной литературе, о неблагоприятных последствиях для здоровья человека применения биопрепаратов на основе *B. thuringiensis* [6, 9]. Таким образом, особо актуальной на данный момент является всесторонняя оценка действия дельта-эндотоксина *B. thuringiensis* на теплокровных животных.

### **Цель исследования**

Целью данного исследования явилась оценка влияния дельта-эндотоксина на активность трансаминаз в сыворотке крови, продолжительность жизни и массу тела лабораторных животных. На основании результатов исследования активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ), аспаратаминотрансферазы (АсАТ) и аланинаминотрансферазы (АлАТ) в сыворотке крови можно сделать заключение о характере изменений, происходящих внутри клеток тканей и выявить нарушения в работе органов, т.к. именно эти ферменты способны выходить в межклеточное пространство в результате нарушения целостности клеточных мембран [5].

### **Материал и методы исследования**

Материалом исследования послужили 40 беспородных белых крыс, которых в возрасте 240 суток разделили на контрольную и три (I, II, III) опытные группы. Исследуемый период постнатального онтогенеза включает фазы стабильного и регрессивного роста животных, характеризующиеся отсутствием в тканях органов

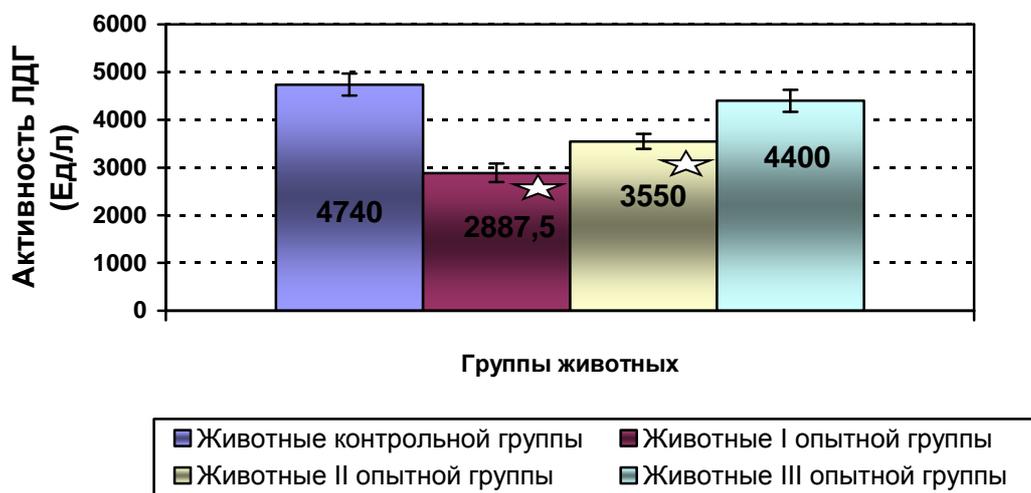
массового деления клеток и увеличения их размеров, относительным постоянством линейных размеров и массы тела, а также интенсивным накоплением жировых запасов и преобладанием процессов диссимиляции над ассимиляцией [4].

Животным I, II и III опытных групп ежедневно в течение 3 месяцев перорально с пищей вводили раствор кристаллов дельта-эндотоксина из расчета 4 мг/кг массы животного, 8 мг/кг и 16 мг/кг соответственно. В работе использовали штамм 617 подвида *B. thuringiensis subsp. sotto*, полученный из ФГУП ГосНИИ Генетики и селекции промышленных микроорганизмов. Поверхностное культивирование осуществляли в термостатах при 27°C в чашках Петри на агаризованной питательной среде РПА, pH=7,2–7,5. Биомассу *B. thuringiensis*, содержащую кристаллы эндотоксинов и споры продуцента, отмывали дистиллированной водой от компонентов питательной среды и водорастворимых токсинов. Кристаллы предварительно выделяли в чистом виде, используя двухфазную систему: 1% водный раствор сульфата натрия – четыреххлористый углерод. При этом кристаллы переходили в водную фазу, из которой их осаждали центрифугированием. Щелочную экстракцию дельта-эндотоксина выполняли по методу Кукси. Затем раствор подвергали диализу и доводили водой до необходимой концентрации. Очистку дельта-эндотоксинов завершали микрофльтрацией через бактериальные фильтры (диаметр пор 0,4 мкм). В экспериментах использовали свежеприготовленные растворы дельта-эндотоксина. Уровень белка определяли по методике Лоури.

Для биохимического исследования сывороток крови экспериментальных животных использовали наборы: «ЛДГ-Олвекс Диагностикум» (для определения активности ЛДГ оптимизированным кинетическим методом), «АсАТ-15- Олвекс Диагностикум» (для определения активности АсАТ энзиматическим кинетическим методом) и «АЛТ-1-Олвекс Диагностикум» (для определения активности АлАТ диагностическим энзиматическим кинетическим методом). Активность ферментов выражали в Ед/л, где Ед – единица активности фермента, предусмотренная диагностическим тестом. Взвешивание животных проводилось еженедельно перед утренним кормлением с помощью лабораторных электронных весов ВМ 153М. Полученные данные подвергали статистической обработке с определением критерия значимости (Т) по Стьюденту, уровень значимости был принят  $p < 0,05$ . Все эксперименты на животных осуществляли в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ Минвуза от 13.11.1984 г. №724) и «Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» от 18 марта 1986 г.

## Результаты исследования и их обсуждение

В ходе исследования было установлено, что активность ЛДГ в сыворотке крови у животных I и II групп составляет  $2887,5 \pm 197,72$  Ед/л и  $3550 \pm 158,11$  Ед/л соответственно. Тогда как у животных контрольной группы этот показатель составляет  $4740 \pm 304,76$  Ед/л, а у животных III опытной группы -  $4400 \pm 228,04$  Ед/л (рис. 1).

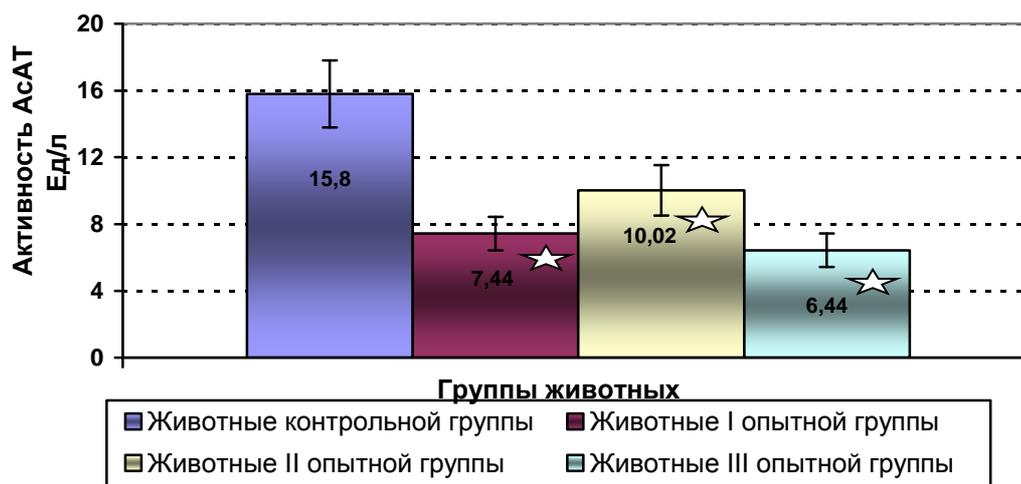


☆- достоверные отличия от контрольных значений ( $p < 0,05$ )

**Рис. 1 Активность лактатдегидрогеназы в сыворотке крови животных экспериментальных групп**

Снижение активности данного фермента у животных I и II групп указывает на увеличение аэробности условий, которое было вызвано действием дельта-эндотоксина. Переход в присутствии кислорода от анаэробного гликолиза к дыханию, обеспечивает переключение клетки на наиболее эффективный и экономичный путь получения энергии.

При этом активность другого фермента – АсАТ – в сыворотке крови у животных всех опытных групп значительно ниже, чем у животных контрольной группы (рис. 2).



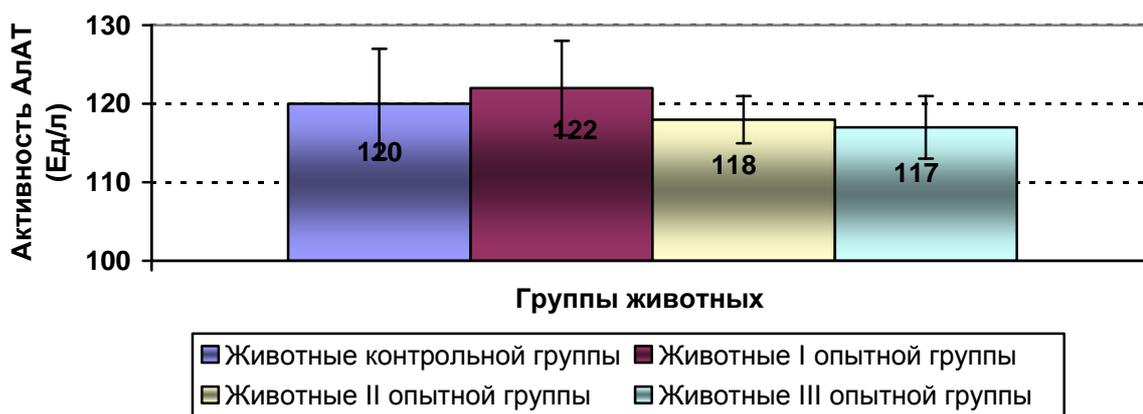
☆ - достоверные отличия от контрольных значений ( $p < 0,05$ )

**Рис. 2 Активность аспаратаминотрансферазы в сыворотке крови животных экспериментальных групп**

Активность АсАТ в сыворотке крови у животных контрольной группы составляет  $15,8 \pm 1,34$  Ед/л, тогда как у животных I, II и III опытных групп -  $7,44 \pm 1,5$  Ед/л,  $10,2 \pm 2,1$  Ед/л и  $6,44 \pm 1,6$  Ед/л соответственно. Следовательно, снижение активности АсАТ в сыворотке крови у животных опытных групп происходит в 2, 1,5 и 2,5 раза по сравнению с таковым показателем у животных контрольной группы.

В литературе имеются данные о том, что повышенные значения активности ферментов крови являются нормой для процесса старения [10]. Таким образом, наблюдаемое снижение активности ферментов в сыворотке крови у животных одного и того же возраста во всех опытных группах может свидетельствовать об уменьшении степени разрушения клеток под действием дельта-эндотоксина *B. thuringiensis*.

В активности АлАТ не было отмечено достоверных отличий между животными экспериментальных групп. Все значения активности фермента, полученные в каждой группе животных, являются физиологически нормальными для белых крыс (рис. 3). Этот факт согласуется с литературными данными об отсутствии влияния возрастных изменений в организме на активность данного фермента.



**Рис. 3 Активность аланинаминотрансферазы в сыворотке крови животных экспериментальных групп**

При пероральном введении крысам дельта-эндотоксина *B. thuringiensis* в общем состоянии животных опытных групп не было отмечено каких-либо особенностей. Их внешний вид, состояние шерстного покрова, активность потребления корма и воды не отличались от животных контрольной группы.

Анализ данных проведенного нами исследования показал, что продолжительность жизни животных III опытной группы была достоверно на 4% выше таковой животных контрольной и I, II опытных групп (таблица 1). Примечательно, что в конце эксперимента средняя масса животных I группы на 11%, II и III групп на 13% превышала массу животных контрольной группы. Сохранение массы тела у животных опытных групп мы склонны рассматривать как результат замедления развития атрофических процессов в мышечной ткани взрослых животных.

Таблица 1

**Продолжительность жизни и увеличение средней массы животных контрольной и опытных групп**

Группа животных	Продолжительность жизни (сутки)	Средняя масса животных в конце эксперимента, г	Превышение массы тела животных опытных групп по отношению к контрольным животным, %
Контрольная	342±2	298,29±2,31	
I опытная	344±3	335,16±5,3*	11
II опытная	345±2	342,3±6,35*	13
III опытная	360±5*	342,43±7,76*	13

\* - достоверные отличия от контрольных значений ( $p < 0,05$ )

### **Заключение**

Приведенные данные свидетельствуют о том, что пероральное введение дельта-эндотоксина *B. thuringiensis* оказывает существенное влияние на активность ЛДГ и АсАТ в сыворотке крови белых крыс, а также на продолжительность их жизни и массу. Наблюдаемое снижение активности ферментов в сыворотке крови у животных всех опытных групп под действием дельта-эндотоксина *B. thuringiensis* может свидетельствовать об уменьшении степени разрушения клеток с возрастом. Сохранение массы тела у животных опытных групп мы склонны рассматривать как результат замедления развития атрофических процессов в мышечной ткани взрослых животных.

Полученные результаты не выявили токсического воздействия (прямого) дельта-эндотоксина данного подвида на млекопитающих. Его можно рассматривать скорее как благоприятное, в пользу чего свидетельствует снижение активности ЛДГ и АсТ, а также влияние на продолжительность жизни и массу тела.

### **Список литературы**

1. Аналитика - Российский рынок биотехнологий [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.abercade.ru/> (дата обращения: 05.09.2014).
2. Вершинина В.И. Продукты на основе микробной биомассы / В.И. Вершинина, Ф.К. Алимова // Микробная биотехнология. – Казань: Унипресс: ДАС, 2000. – С. 125-200.
3. Киль В. И. Выгоды и преимущества возделывания трансгенных растений / В.И. Киль, В.Я. Исмаилов, В.Д. Надыкта // Достижения науки и техники АПК. – 2003. - № 10. – С. 26-30.
4. Махинько В.И. Константы роста и функциональные периоды развития в постнатальной жизни белых крыс / В. И. Махинько, В. И. Никитин // Молекулярные и физиологические механизмы возрастного развития: сб. науч. работ. – Киев: Наукова Думка, 1975. – С. 308-326.
5. Северин С.А. Функциональная активность ферментов и пути ее регуляции / С.А. Северин, Г.А. Кочетов. - М.: Изд-во МГУ, 1981. – 204 с.
6. Damgaard P.H. Enterotoxin - producing strains of *Bacillus thuringiensis* isolated from food / Damgaard P.H., Larsen H.D., Hansen B.M., Bresciani J., Jorgensen K. // Letters in Applied Microbiology. - 2008. Vol. 23. - P. 146-150.
7. Je YH *Bacillus thuringiensis* as a specific, safe, and effective tool for insect pest control// Journal of microbiology and biotechnology. 2007. 17 (4). – P. 547–559.

8. Mezzomo B.P. Hematotoxicity of Bacillus thuringiensis as Spore-crystal Strains Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac or Cry2Aa in Swiss Albino Mice / Bélin Poletto Mezzomo, Ana Luisa Miranda-Vilela, Ingrid de Souza Freire // J Hematol Thromb Dis. 2013. – <http://dx.doi.org/10.4172/2329-8790.1000104> (дата обращения: 05.09.2014).
9. Richard B. Adverse health consequences following aerial spraying with Bacillus thuringiensis (var. kursraki) (Btk) to control the gypsy moth: flaws in government risk assessments and in public health officials attitudes / Richard B., Philp // University of Western Ontario, 2009. – P. 48-56.
10. Tietz NW A two-year longitudinal reference range study for selected serum enzymes in a population more than 60 years of age / Tietz NW, Wekstein DR, Shuey DF, Brauer GA. // J Am Geriatr Soc., 1984.- Aug;32(8) - P. 563-570.

**Рецензенты:**

Гондарева Л.Н., д.б.н., профессор кафедры физиологии труда и спорта ФГБОУ ВПО «Ульяновский государственный университет», г. Ульяновск;

Чураков Б.П., д.б.н., профессор, заведующий кафедрой лесного хозяйства ФГБОУ ВПО «Ульяновский государственный университет», г. Ульяновск.