

ВЛИЯНИЕ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА AZOSPIRILLUM LIPOFERUM Sp59b НА АКТИВНОСТЬ КЛЮЧЕВЫХ ФЕРМЕНТОВ МЕТАБОЛИЗМА МЫШЕЙ

¹Фомина А.А., ²Малинин М.Л., ³Коннова С.А., ¹Тихомирова Е.И.

¹ФГБОУ ВПО «Саратовский государственный технический университет им. Гагарина Ю.А.», Саратов, e-mail: fomina-aa@mail.ru, tichomirova_ei@mail.ru

²ФГБНУ «Саратовский НИВИ Россельхозакадемии», Саратов, e-mail: mik-malinin@yandex.ru

³ФГБОУ ВПО «Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского», Саратов, e-mail: KonnovaSA@yandex.ru

Исследовано влияние введения липополисахарида (ЛПС) *Azospirillum lipoferum* Sp59b в дозе 0,1 мкг/мышь на активность ключевых ферментов метаболизма экспериментальных животных. При изучении острой токсичности ЛПС на мышах определена LD₅₀, которая составила 8,9 мкг, что указывает на слабую токсичность препарата по сравнению с классическим эндотоксином ЛПС *Escherichia coli* 055:B5. Активность ряда важнейших ферментов углеводного обмена (аспартатаминотрансферазы, аланинаминотрансферазы, креатинкиназы, лактатдегидрогеназы) была понижена при введении ЛПС, что свидетельствует о возрастании анаболических процессов биосинтеза органических веществ в организме мышей. Не установлены серьезные нарушения в функционировании сердечной мышцы, признаки острой почечной и печеночной недостаточности у животных под действием ЛПС. Показано, что препарат стимулирует продукцию нитрогенных форм внутри клеток, однако мало влияет на кислородзависимые бактерицидные механизмы в макрофагах мышей.

Ключевые слова: липополисахарид, *Azospirillum*, ферменты, метаболизм, иммуностимулятор

INFLUENCE OF THE LIPOPOLYSACCHARIDE OF AZOSPIRILLUM LIPOFERUM Sp59b ON THE ACTIVITY OF MAIN ENZYMES IN THE METABOLISM OF MICE

¹Fomina A.A., ²Malinin M.L., ³Konnova S.A., ¹Tikhomirova E.I.

¹Yuri Gagarin State Technical University of Saratov, e-mail: fomina-aa@mail.ru, tichomirova_ei@mail.ru

² Saratov Scientific and Research Veterinary Station of the Russian Academy of Agricultural Sciences, e-mail: mik-malinin@yandex.ru

³ Saratov State University, e-mail: KonnovaSA@yandex.ru

We investigated the influence of injection of lipopolysaccharide (LPS) *Azospirillum lipoferum* Sp59b dose of 0.1 µg/mouse on the activity of main enzymes of the metabolism of the experimental animals. In the study of acute toxicity of LPS in mice determined LD₅₀ = 8.9 mg, which indicating low toxicity of the drug in comparison with the classical endotoxin LPS *Escherichia coli* 055:B5. The activity of some key enzymes of carbohydrate metabolism (aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, creatine kinase, lactate dehydrogenase) was reduced with the introduction of LPS, indicating the growing anabolic processes of biosynthesis of organic substances in mice. We don't established a serious breach in the functioning of the heart muscle, signs of acute renal and liver failure in animals exposed to LPS. It is shown that the drug stimulates the production of nitrogen form inside the cells, but doesn't influence on the oxygen-dependent bactericidal mechanisms of macrophages of mice.

Keywords: lipopolysaccharide, *Azospirillum*, enzymes, metabolism, immunostimullator

Липополисахариды (ЛПС) являются неотъемлемыми компонентами оболочки грамотрицательных бактерий, в том числе и ассоциативных свободноживущих ризобактерий рода *Azospirillum*. Данный род микроорганизмов широко распространен в природе и активно используется в последнее время в качестве компонентов биоудобрений [11]. Известно, что азоспириллы способны экскретировать ЛПС в составе ЛПБК в окружающую среду, однако механизм и степень их воздействия на макроорганизмы слабо изучены.

ЛПС обладает свойствами эндотоксина и способен индуцировать ряд биологических процессов: активацию макрофагов и лейкоцитов, стимуляцию продукции эндогенного пирогена, интерферона, интерлейкинов и других медиаторов, активацию синтеза белков острой фазы, митогенный эффект и иное вплоть до эндотоксинового шока и острой полиорганной недостаточности. Тем не менее воздействие эндотоксинов на организм оценивается неоднозначно [8]. Биологический эффект ЛПС в отношении теплокровных животных и человека в значительной степени зависит от его состава и структуры, а также от концентрации полимера. Ранее в исследованиях *in vitro* нами было показано, что ЛПС *Azospirillum lipoferum* Sp59b (ЛПС_{Sp59b}) в диапазоне концентраций 0,01–1 мкг/мл активирует процесс фагоцитоза, стимулирует продукцию миелопероксидазы макрофагами, индуцирует синтез основных провоспалительных цитокинов ИЛ-1 β , ИЛ-8 и ФНО- α клетками цельной крови человека, а также оказывает выраженное пролиферативное действие на мышинные спленоциты [7]. В связи с этим целью данной работы стало выявление влияния ЛПС_{Sp59b} *in vivo* на активность ключевых ферментов белкового, углеводного, липидного обменов, а также на метаболическое состояние лейкоцитов белых мышей.

Материалы и методы исследования

В экспериментах использовали 42 лабораторные белые мыши весом 18–21 г, содержание и эвтаназия которых соответствовали требованиям Европейской конвенции по защите экспериментальных животных 86/609 ЕЕС. Острую токсичность ЛПС_{Sp59b} определяли при однократном внутрибрюшинном введении мышам, предварительно сенсибилизированным 3,2%-ным D-галактозамингидрохлоридом [5].

Для исследований активности ЛПС препарат вводили внутрибрюшинно однократно в дозе 0,1 мкг/мышь. Через 1, 3 и 5 суток животных умерщвляли методом транслокации шейных позвонков. Перитонеальные макрофаги, спленоциты и кровь выделяли из организма мышей по общепринятым методикам [4]. Биохимические исследования сыворотки крови выполняли с использованием полуавтоматического биохимического анализатора BS 3000 P Sinnova, КНР. Активность аспартатаминотрансферазы (АСТ), аланинаминотрансферазы (АЛТ), лактатдегидрогеназы (ЛДГ), креатинкиназы (КК), щелочной фосфатазы (ЩФ), общей кислой фосфатазы (КФ), липазы, а также содержание глюкозы, общего белка, альбумина, глобулина, мочевины, креатинина, общего холестерина, α -холестерина, железа и ионизированного кальция определяли стандартными общепринятыми методиками [2]. Для более полной характеристики метаболического статуса животных вычисляли интегральный показатель энергетического обмена – индекс ферментемии по формуле: ИФ = АСТ/АЛТ + АСТ/ЛДГ + КК/ЛДГ. Гемоглобин исследовали гемиглобинцианидным методом D.L. Drabkin, а количество лейкоцитов подсчитывали в камере Горяева [3]. Активность миелопероксидазы

(МПО) и продукцию активных форм кислорода (АФК) в перитонеальных макрофагах оценивали спектрофотометрически. Интенсивность продукции NO спленоцитами определяли методом Грисса. Полученные данные подвергали статистической обработке стандартными методиками.

Результаты исследования и их обсуждение

Исследование физиологической активности ЛПС имеет практический интерес только в том случае, если предполагаемый протекторный эффект препарата сочетается с его низкой собственной токсичностью. В предварительных экспериментах при изучении острой токсичности ЛПС_{Sp59b} на мышах определена LD₅₀, которая составила 8,9 мкг, что было в 60 раз меньше по сравнению с действием классического эндотоксина ЛПС *Escherichia coli* 055:B5. Полученные данные свидетельствуют о слабой токсичности препарата ЛПС_{Sp59b}, состав жирных кислот липида А и структура О-специфического полисахарида которого исследованы ранее [1, 9]. Данные о низкой токсичности препаратов ЛПС_{Sp59b} азоспирилл коррелируют с результатами, полученными для ЛПС штамма *A. brasilense* Sp245 [6], а также данными польских коллег [10].

Для исследования выбрано внутрибрюшинное введение препарата в дозе 0,1 мкг/мышь, поскольку данная концентрация в экспериментах *in vitro* индуцировала достоверные изменения иммунологических и биохимических показателей в клетках человека и экспериментальных животных. Сроки наблюдения (1-е, 3-и и 5-е сутки) определили исходя из известных данных о возникновении обменных нарушений в течение первых суток после попадания классического эндотоксина в организм, а на 3–5-е сутки приходится начало восстановительных процессов.

Установлено, что активность аминотрансфераз АСТ- и АЛТ-ферментов, осуществляющих взаимосвязь между обменом азотистых соединений и углеводов, была достоверно понижена по сравнению с контролем уже через 1 сутки после введения ЛПС_{Sp59b} и оставалась приблизительно на данном уровне на 3-и и 5-е сутки действия препарата (табл.). На фоне введения ЛПС_{Sp59b} показано значительное понижение активности КК (в 4–11 раз) по сравнению с контролем и как следствие — снижение синтеза макроэргического соединения — креатинфосфата. В то же время отмечено достоверное уменьшение активности конечного фермента гликолиза ЛДГ в 2–3 раза у опытных мышей по сравнению с интактной группой животных. Полученные результаты по низкой активности ряда важнейших ферментов углеводного обмена свидетельствуют о значительном энергетическом голодании клеток на фоне введения исследуемого ЛПС.

Таблица

Влияние ЛПС_{59b} на биохимические, гематологические показатели сыворотки крови и функционально-метаболическое состояние мышинных лейкоцитов

Показатель	Интактные мышы	Время после введения ЛПС _{59b} , сут		
		1	3	5
АЛТ, мкМ/мин·л	303±40	51,8±3*	40,5±5*	53,5±6*
АСТ, мкМ/мин·л	2261±350	201,1±18*	254,4±11*	227,7±18*
КК, мкМ/мин·л	9071±875	1333±90*	2500±158*	798±89*
ЛДГ, мкМ/мин·л	6377±236	2066±176*	3127±287*	3642±340*
ЩФ, мкМ/мин·л	74±5	260,9±21*	150,2±17*	377,2±42*
КФ общая, мкМ/мин·л	20±1,8	21,4±2,4	9,0±1,2*	14,8±1,3*
Индекс ферментации	7,8	4,7	7,2	4,6
Липаза, мкМ/мин·л	20±2,3	8,8±0,7*	9,8±0,8*	10,4±1,3*
Общий белок, г/л	65±6	53,0±6	51,2±4*	60,2±5
Альбумин, г/л	37,0±2	37,1±4	45,4±5	49,2±8*
Глобулин, г/л	26,4±4	15,9±2*	5,8±0,8*	11,0±1,5*
Альбумин/глобулиновое соотношение	1,4	2,3	7,8	4,5
Мочевина, мМ/л	7,5±0,9	3,6±0,3*	5,5±0,6*	4,7±0,6*
Креатинин, мкМ/л	95±11	121,0±15	120,0±18	118,5±12
Глюкоза, мМ/л	7,1±0,9	5,7±0,7	2,8±0,3*	4,3±0,5*
Холестерин общий, мМ/л	2,5±0,3	1,5±0,1*	1,3±0,08*	2,1±0,2*
α-Холестерин, мМ/л	1,1±0,02	1,1±0,04	1,2±0,05	1,6±0,13*
Индекс атерогенности	1,2	0,4	0,9	0,8
Железо, мкМ/л	17,9±1,5	20,0±3	29,0±5	36,8±5
Кальций ионизир., мМ/л	1,1±0,07	1,7±0,05*	1,8±0,08*	2,1±0,3*
Гемоглобин, г/л	116±3,5	141±3,0*	126±1,4*	132±2,2*
Лейкоциты, г/л	7,3±1,1	5,2±0,8	4,0±0,6*	3,9±0,6*
НО, мкМ	11±2,1	14±5,6	46±2,5*	19±2,2*
АФК, мкг диформаза/мл	124±11	130±16	136±15	154±17*
МПО, усл. ед.	1,1±0,2	0,9±0,2	2,5±0,4*	1,4±0,2

* — достоверные различия по сравнению с контролем при $p < 0,05$

Для более полной оценки метаболического состояния животных был использован индекс ферментации, который позволяет судить об активности центральных и периферических зон метаболизма. Показано, что ИФ снижался в 1,6 раза у животных к 1-м и 5-м суткам после введения ЛПС, а на 3-и сутки незначительно отличался от контроля. Пониженные значения ИФ в сыворотке крови указывают на возрастание анаболических процессов биосинтеза органических веществ в организме мышей под действием препарата. Данная особенность воздействия ЛПС азоспирилл на активность метаболизма животных была установлена нами ранее при исследовании ЛПС *A. brasilense* Sp245 [6].

Показано, что при введении ЛПС_{Sp59b} в организм белых мышей активность ЩФ увеличивалась в 3 раза на 1-е сутки по сравнению с контролем и оставалась высокой и к 5-м суткам действия препарата; при этом активность КФ на 1-е сутки введения ЛПС была на

уровне контрольных значений, а к 3-м и 5-м суткам ее активность уменьшалась в 1,5–2 раза. Полученные результаты косвенно свидетельствуют о конкуренции ферментов за высокоэнергетический креатинфосфат, так как фосфатазы в организме конкурируют с креатинкиназой за неорганический фосфат. Креатинфосфат, помимо участия в энергетическом обмене, является важнейшим мембранопротектором. Снижение его концентрации сопровождается увеличением цитолиза.

Установлено, что содержание важнейшего диагностического показателя гомеостаза макроорганизма – общего белка в сыворотке крови опытных животных при введении им препарата практически не изменялось на протяжении всего периода исследования. Концентрация альбумина достоверно увеличивалась только на 5-е сутки эксперимента, при этом концентрация глобулина уменьшалась значительно (в 4,5 раза) к 3-м суткам и в 2,5 раза к 5-м суткам действия препарата по сравнению с контролем. Повышенные концентрации фракции глобулинов в сыворотке крови свидетельствуют о резком выбросе белков острой фазы при воспалении, а пониженное их содержание может указывать на увеличение моноцитарно-макрофагальной функции печени. Полученные данные по ряду показателей сыворотки крови мышей при введении им ЛПС_{Sp59b}: незначительное уменьшение общего холестерина к 5-м суткам, не изменяющее содержание общего белка, повышенная концентрация альбумина – могут свидетельствовать о нормальном функционировании печени животных.

Показатели азотистого обмена (мочевину и креатинин) исследовали для оценки функционального состояния почек и исключения почечной недостаточности. При введении ЛПС_{Sp59b} содержание мочевины в сыворотке крови мышей было достоверно ниже контрольных значений (в 1,3–2 раза) на протяжении 5 суток исследования, что подтверждает метаболический сдвиг в сторону пластического обмена, однако показатели находятся в пределах нормы (2,5–8,3 мМ/л). Концентрация креатинина в сыворотке экспериментальных животных достоверно не изменялась по сравнению с контролем, что является положительным признаком, поскольку повышенное содержание креатинина непосредственно указывает на развитие почечной недостаточности у животных и человека.

Установлено, что состояние гипогликемии возникло у мышей только на 3-и сутки после введения ЛПС_{Sp59b} (содержание глюкозы ниже 3,3 ммоль/л), однако к 5-м суткам ее содержание повысилось на 65%. Характерно, что именно на 3-и сутки наблюдались минимальные значения активности АЛТ и общего белка. В совокупности со снижением концентрации глюкозы это может указывать на некоторое разобщение углеводного и белкового обмена, что в свою очередь способствует адаптации животных к неблагоприятным условиям.

Активность липазы в сыворотке крови мышей после введения ЛПС_{Sp59b} была снижена в 2 раза на протяжении 5 суток исследования. Следовательно, интенсивность β -окисления жирных кислот, которые могли бы стать источником ацетил-коэнзима А, идущего далее в цикл Кребса, не повышалась. Установлено, что ЛПС_{Sp59b} обладает антиатерогенными свойствами. Уровень α -холестерина – холестерина липопротеинов высокой плотности, которые транспортируют его от клеток периферических органов к печени, где он переводится в желчные кислоты и выводится из организма, – повышался в 1,5 раза по сравнению с контролем к 5-м суткам действия ЛПС_{Sp59b}. Индекс атерогенности при введении ЛПС_{Sp59b} значительно снижался по сравнению с контролем, особенно на 1-е сутки действия препарата. Определение холестерина крови является важным этапом диагностики заболеваний сердечно-сосудистой системы, атеросклероза и заболеваний печени.

При изучении влияния ЛПС_{Sp59b} на гематологические показатели у белых мышей установлено (табл.), что содержание гемоглобина в крови увеличивалось на 1-е сутки на 20% и составляло $141 \pm 3,0$ г/л, а позже уменьшалось до нормативных значений. В то же самое время концентрация железа последовательно увеличивалась к 5-м суткам после введения препарата животным. Стоит отметить, что содержание железа в крови во многом зависит от уровня гемоглобина. Как правило, распад гемоглобина ведет к высвобождению данного элемента. Количество лейкоцитов достоверно снижалось на 3-и и 5-е сутки после введения ЛПС_{Sp59b} по сравнению с контролем, что свидетельствует об увеличении маргинального пула лейкоцитов. Грамотрицательный сепсис часто сопровождается гипокальциемией в связи с выходом кальция через нарушенную систему микроциркуляции, а также нарушением гемодинамики. В наших исследованиях содержание кальция в крови мышей было достоверно выше контроля в 1,5–2 раза на протяжении всего периода исследования действия ЛПС_{Sp59b}.

Одновременно нами было проведено исследование специфических ферментативных систем мышинных лейкоцитов для оценки их функционального состояния (табл.). Показано, что введение ЛПС_{Sp59b} значительно активировало образование NO мышинными спленоцитами (в 4 раза больше по сравнению с контролем только к 3-м суткам); к 5-м суткам содержание NO уменьшалось, однако оставалось достоверно выше контроля (в 2 раза). NO является противовоспалительным и цитотоксическим в отношении опухолевых клеток фактором, а также индикатором активности индуцибельной NO-синтазы. В отношении механизмов кислородзависимого киллинга препарат не проявил значительного эффекта: содержание АФК в НСТ-тесте с мышинными макрофагами незначительно увеличивалось к 5-м суткам действия препарата, а активность МПО увеличивалась достоверно на 3-и сутки введения ЛПС, а к 5-м суткам находилась на уровне контроля.

Таким образом, в ходе исследования активности основных ферментов обменных процессов белых мышей при введении им ЛПС_{Sp59b} в концентрации 0,1 мкг/мышь не установлены серьезные нарушения в функционировании сердечной мышцы, признаки острой почечной и печеночной недостаточности. Однако понижение активности ряда ключевых ферментов углеводного обмена свидетельствует об энергетической недостаточности клеток макроорганизма при воздействии препарата. Показано, что ЛПС_{Sp59b} смещает метаболические процессы у белых мышей в сторону пластического обмена. При изучении функционально-метаболического состояния выделенных лейкоцитов установлено, что ЛПС_{Sp59b} *in vivo* значительно стимулирует продукцию нитрогенных форм внутри клеток, однако мало влияет на кислородзависимые бактерицидные механизмы в макрофагах. Результаты, полученные в ходе этих и ранее проведенных исследований ЛПС_{Sp59b} *in vivo* и *in vitro*, свидетельствуют о низкой токсичности препарата и перспективности использования ЛПС азоспирилл в малых дозах в качестве индукторов факторов неспецифической резистентности.

Список литературы

1. Игнатов В.В., Коннова О.Н., Бойко А.С., Фомина А.А., Федоненко Ю.П., Коннова С.А. Характеристика составов жирных кислот липидов А липополисахаридов бактерий рода *Azospirillum* // Известия Саратовского университета. Серия Химия. Биология. Экология. – 2009. – Т. 9. – Вып. 1. – С. 36–41.
2. Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике: в 2 т. / В.С. Камышников. – Минск: Беларусь, 2000. – Т. 1. – 495 с.
3. Лабораторная гематология / С.А. Луговская [и др.]. – М.: Юнимед-пресс, 2002. – 115 с.
4. Практикум по иммунологии / Под ред. Кондратьевой И.А., Самуилова В.Д. – М.: МГУ, 2001. – 224 с.
5. Прозоровский В.Б., Прозоровская М.П., Демченко В.М. Экспресс-метод определения средней эффективной дозы и ее ошибки // Фармакология и токсикология. – 1978. – № 4. – С. 497–502.
6. Фомина А.А., Малинин М.Л., Коннова С.А., Тихомирова Е.И. Биохимические и гематологические показатели у мышей при введении ЛПС *Azospirillum brasilense* Sp245 // Токсикологический вестник. – 2009. – № 6. – С. 52–53.
7. Фомина А.А., Петров А.В., Коннова С.А., Бойко А.С., Федоненко Ю.П., Тихомирова Е.И., Симбирцев А.С. Влияние ЛПС азоспирилл на активность факторов неспецифической резистентности макроорганизма // Цитокины и воспаление. – 2009. – Т. 8. – № 4. – С. 23–27.

8. Яковлев М.Ю. «Эндотоксиновая агрессия» как предболезнь или универсальный фактор патогенеза заболеваний и животных // Успехи современной биологии. – 2003. – Т. 123. – № 1. – С. 31–40.
9. Fedonenko Yu.P., Konnova O.N., Zatonsky G.V., Shashkov A.S., Konnova S.A., Kocharova N.A., Zdrovenko E.L., Ignatov V.V., Knirel Yu.A. Structure of the O-specific polysaccharide from the lipopolysaccharide of *Azospirillum lipoferum* Sp59b // Carbohydrate Research. – 2005. – V. 340. –P. 1259–1263.
10. Komaniacka I., Zdzisinska B., Kandefer-Szerszen M., Choma A. Low endotoxic activity of lipopolysaccharides isolated from Bradyrhizobium, Mesorhizobium, and Azospirillum strains // Microbiol Immunol. 2010;54(12):717-25.
11. Lucy M., Reed E., Glik R. Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria // Ant.van Leeuwenhoek. – 2004. –V.86. – P. 1–25.

Рецензенты:

Карпунина Л.В., д.б.н., профессор кафедры микробиологии, биотехнологии и химии ФГБОУ ВПО «Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова», г. Саратов;

Шелудько А.В., д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории генетики микроорганизмов Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов, г. Саратов.