УДК 579.017.7

ВЛИЯНИЕ ТРАНСАМИНАЗ, ВЫДЕЛЯЕМЫХ PSEUDOMONAS AERUGINOSA, НА ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ МЕТАБОЛИЗМ ПЕРИТОНЕАЛЬНЫХ КЛЕТОК МОРСКОЙ СВИНКИ И МЫШИ IN VITRO

[1]Тарасенко Т.Н., [1]Габалов К.П., [1]Рюмина М.В., [1,2]Староверов С.А., [1,2]Волков А.А.

[1]ФГБНУ «Саратовский научно-исследовательский ветеринарный институт», Саратов, e-mail: sarnivi@mail.ru;
[2]ФГБОУ ВО Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова, Саратов

Вирулентные и авирулентные клинические изоляты *Pseudomonas aeruginosa* при росте на искусственной среде способны выделять ферментативные активности аланинаминотрансферазу (АЛТ) и аспартатаминотрансферазу (АСТ). Данные ферменты, наряду с их липополисахаридом, стимулируют дыхательную активность перитонеальных клеток (ПК) мыши и морской свинки in vitro. Стимулирующее влияние АЛТ и АСТ опосредовано потребностью ПК в их продуктах – пирувате и α-кетоглутарате. В ходе выполнения данной научно-исследовательской работы была обнаружена способность культур вирулентных и авирулентных изолятов *P. aeruginosa* выделять в среду ферментативные активности АСТ и АЛТ, кроме того было выполнено определение характера влияния указанных ферментов на дыхание перитонеальных клеток мыши и морской свинки в присутствии ЛПС указанных изолятов псевдомонад.

Ключевые слова: Pseudomonas aeruginosa, АЛТ, АСТ, перитонеальныеклетки, липополисахариды

INFLUENCE OF TRANSAMINASES, EXCRETED BY PSEUDOMONAS AERUGINOSA, ON OXIDATIVE METABOLISM OF PERITONEAL CELLS OF GUINEA PIGS AND MOUSE IN VITRO

[1]Tarasenko T.N., [1]Gabalov K.P., [1]Ryumina M.V., [1,2]Staroverov S.A., [1,2]Volkov S.A.

[1]Saratov scientific-research veterinary institute, Saratov, e-mail: sarnivi@mail.ru;
[2]Saratov State Agrarian University Named After N.I. Vavilov, Saratov

Virulent and avirulent clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa could excrete the enzymatic activity of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) during the growth in artificial medium.These enzymes, along with their lipopolysaccharide, stimulate respiratory activity of peritoneal cells (PC) mouse and guinea pig in vitro. The stimulating effect of ALT and AST on PC is mediated of their needs in products of the enzymes – pyruvate and alpha-ketoglutarate. In the course of this research work it was discovered the ability of cultures of virulent and avirulent isolates of P. aeruginosa isolate on Wednesday enzymatic activity of AST and ALT were also performed to determine the nature of these enzymes influence on breathing mouse peritoneal cells and guinea pig in the presence of LPS of these isolates Pseudomonas.

Keywords: Pseudomonas aeruginosa, ALT, AST, peritoneal cells, lipopolysaccharide

Pseudomonas aeruginosa обладает различными факторами вирулентности, одним из которых является липополисахарид (ЛПС). Он накапливается в организме при лизисе бактериальных клеток и вызывает разнообразные поражения организма. При этом в окружающую среду выделяются и разнообразные ферменты, в частности, ферменты энергетического обмена. Ранее для крыс было показано *in vitro* выделение гепатоцитами АСТ и АЛТ в ответ на ЛПС изолятов *P. aeruginosa* и влияние этих ферментов на дыхание активированных данными ЛПС перитонеальных клеток (ПК), при этом дыхание зависит от активности АЛТ и АСТ [1]. Также было показано, что дыхание перитонеальных клеток морской свинки при фагоцитозе клеток *Mycobacterium bovis* стимулируется АЛТ и АСТ in vitro [2].

Целью данной работы было обнаружение способности культур вирулентных и авирулентных изолятов *P. aeruginosa* выделять в среду ферментативные активности АСТ и АЛТ, и определение характера влияния указанных ферментов на дыхание перитонеальных клеток мыши и морской свинки в присутствии ЛПС указанных изолятов псевдомонад.

Материалы и методы исследования

В работе использовались изоляты *P. aeruginosa* 4, 8 (вирулентные), 11, 12, (авирулентные). Из суточных культур изолятов на жидкой среде № 8 (Оболенск) получали очищенные центрифугированием (20000g, 40 мин) культуральные жидкости (КЖ) и клетки бактерии. В полученных супернатантах определяли концентрацию белка, активность АСТ, АЛТ и рассчитывали отношение АСТ/АЛТ (коэффициент Де Ритиса) [3]. Из клеток изолятов получали ЛПС по Вестфалю [6].

Определяли дыхание перитонеальных клеток (ПК) в тесте восстановления нитросинего тетразолия (тест НСТ) [5, 7, 8] при ответе на ЛПС *P. aeruginosa* 8 в зависимости от концентрации пирувата и α-кетоглутарата. ПК мыши и морской свинки (от 10 животных каждого вида) суспендировали в среде ДМЕМ до концентраций 1 млн клеток/мл; в суспензии вносили нитросиний тетразолий (НСТ) до конечной концентрации 0,01 %. Суспензии ПК делили на ряд аликвот, в аликвоты, кроме контрольной, вносили ЛПС *P. aeruginosa* 8 до конечной концентрации 4 мкг/мл. В аликвоты суспензий ПК добавляли пируват в концентрациях 54 – 120 мкМ/л, α-кетоглутарат – от 23 до 51 мкМ/л и их сочетания. Суспензии ПК инкубировали 1 час при 37 °С, определяли накопление формазана спектрофотометрически.

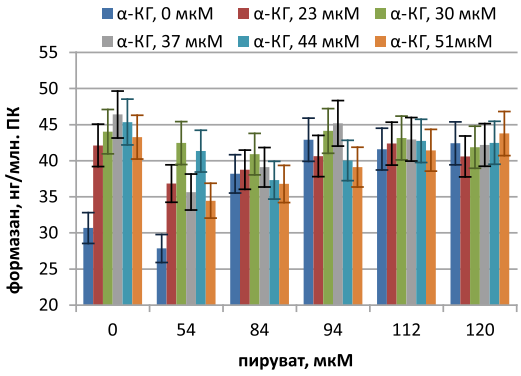
Влияние культуральных жидкостей изолятов *P. aeruginosa* на дыхание ПК определяли аналогично описанному выше. ПК мыши и морской свинки суспендировали в среде 199, добавляли 1/10 объема КЖ, получая суспензии 1 млн клеток/мл, вносили ЛПС соответствующего изолята до 4 мкг/мл и определяли накопление формазана в тесте НСТ.

Определяли коэффициенты корреляции Пирсона и множественной корреляции между дыханием ПК в тесте НСТ и концентрациями пирувата и α-кетоглутарата, а также активностями АЛТ, АСТ и значениями коэффициента Де Ритиса [4].

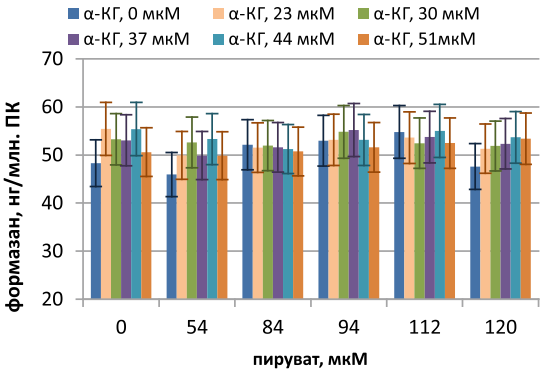
Результаты исследования и их обсуждение

Накопление формазана в тесте НСТ ПК мыши и морской свинки, стимулированных ЛПС *P. aeruginosa* 8, в присутствии пирувата и α-кетоглутарата представлено на рисунке. ЛПС стимулирует дыхание, дыхание контрольных ПК мыши составляет 27 ± 6 нг/млн. клеток, контрольных ПК морской свинки – 34 ± 5 нг/млн. клеток. А-кетоглутарат и пируват стимулируют дыхание ПК, причем первый заметно сильнее при 37 мкМ, второй – при 94 мкМ. При этом максимум дыхания ПК как мыши, так и морской свинки достигается при сочетании пируват/α-кетоглутарат 94/37 мкМ, т.е. при концентрациях, соответствующих их средним концентрациям в плазме крови. Влияние пирувата и α-кетоглутарата на дыхание более выражено для ПК мыши.

Корреляционный анализ более отчетливо выявляет связь дыхания с пируватом и α-кетоглутаратом (табл. 1).



А



Б

Дыхание перитонеальных клеток мышей (А) и морских свинок (Б), стимулированных ЛПС P. aeruginosa 8, в присутствии пирувата и α-кетоглутарата (α-КГ)

Таблица 1

Значения коэффициентов корреляции Пирсона (r) и множественной корреляции (R) дыхания перитонеальных клеток мыши и морской свинки с пируватом и α-кетоглутаратом в присутствии ЛПС P. Aeruginosa 8

		НСТ ПК мыши	НСТ ПК морской свинки
Пируват, r	С чистым пируватом	+ 0,83	+ 0.46
	В присутствии α-кетоглутарата	+ 0,96	+ 0.89
α-кетоглутарат, r	С чистым α-кетоглутаратом	+ 0,86	+ 0.43
	В присутствии пирувата	+ 0,93	+ 0.87
Корреляция с парой пируват/α-кетоглутарат, R		0,96	0.90

Примечание: жирным шрифтом выделены достоверные значения коэффициентов корреляции ($p < 0.05$).

Таблица 2

Биохимические параметры культуральных жидкостей изолятов P. aeruginosa

	изолят	Белок, г/л	АСТ, нкат/л	АЛТ, нкат/л	Коэффициент Де Ритиса
вирулентные	4	0,49 ± 0,1	0,47 ± 0,1	0,20 ± 0,1	2,31 ± 0,3
	8	1,82 ± 0,3	3,92 ± 0,5	1,00 ± 0,2	3,91 ± 0,5
авирулентные	11	0,99 ± 0,2	2,60 ± 0,4	0,45 ± 0,1	5,67 ± 0,6
	12	1,53 ± 0,2	0,73 ± 0,2	0,33 ± 0,1	2,26 ± 0,3

Таблица 3

Накопление формазана перитонеальными клетками (ПК) морской свинки и мыши в присутствии культуральных жидкостей (КЖ) и липополисахарида (ЛПС) изолятов P. aeruginosa, нг формазана на млн. ПК

	Вирулентные изоляты		Авирулентные изоляты		Среда ДМЕМ
	КЖ + ЛПС изолята 4	КЖ + ЛПС изолята 8	КЖ + ЛПС изолята 11	КЖ + ЛПС изолята 12	
ПК морской свинки	14,1 ± 1,6	19,7 ± 6,1	20,6 ± 4,7	17,9 ± 2,6	11,9 ± 1,5
ПК мыши	8,4 ± 0,6	8,9 ± 0,7	8,7 ± 0,9	8,4 ± 0,7	7,8 ± 0,5

Примечание: жирным шрифтом выделены значения, достоверно отличающиеся от контроля ($p < 0.05$).

Таблица 4

Значения коэффициентов корреляции Пирсона дыхания перитонеальных клеток (ПК) мыши и морской свинки с активностью АЛТ, АСТ и коэффициентом Де Ритиса в присутствии ЛПС P. aeruginosa

	ПК мыши	ПК морской свинки
Корреляция с АЛТ	+ 0,69	+ 0,67
Корреляция с АСТ	+ 0,65	+ 0,70
Корреляция с коэффициентом Де Ритиса	+ 0,60	+ 0,42

Примечание: жирным шрифтом выделены достоверные значения коэффициентов корреляции ($p < 0.05$).

Дыхание ПК мыши связано с обеими кетокислотами вместе и с каждой из них в отдельности, однако и дыхание ПК морской свинки в присутствии обеих кетокислот связано с каждой из них. Об этом же свидетельствуют высокие достоверные коэффициенты множественной корреляции дыхания ПК с парой пируват/α-кетоглутарат, т.е. обе кетокислоты стимулируют дыхание ПК обоих видов животных. Результат вполне объясним тем, что эти кетокислоты утилизируются в цикле Кребса, рост их концентрации в среде позволяет усилить дыхательный метаболизм ПК при ответе на антиген.

Изоляты *P. aeruginosa* выделяют в культуральную жидкость заметное количество белка и активности АСТ и АЛТ (табл. 2). Выделение ферментативных активностей соотносится с выделением белка и не имеет выраженной связи с вирулентностью изолята.

Культуральные жидкости в сочетании с ЛПС изолятов *P. aeruginosa* оказывают стимулирующее влияние на дыхание ПК, причем это влияние мало зависит от вирулентности изолята (табл. 3).

Дыхание перитонеальных клеток положительно связано с активностями АЛТ и АСТ, а также с коэффициентом Де Ритиса, о чем свидетельствуют значения коэффициентов корреляции Пирсона между дыханием ПК и указанными биохимическими параметрами КЖ (табл. 4).

В среде ДМЕМ отсутствовали специфические факторы регуляции активности перитонеальных клеток со стороны макроорганизма (комплемент, интерлейкины и т.д.), это означает, что действие трансаминаз на дыхание связано именно с катализируемыми трансаминазами биохимическими реакциями.

АЛТ катализирует обратимое превращение L-аланина и α-кетоглутарата в пируват и L-глутматат, АСТ стимулирует обратимое превращение L-аспартата и α-кетоглутарата в оксалоацетат и L-глутматат. Сопряжен-

ные реакции, катализируемые АЛТ и АСТ, способны поддерживать равновесную концентрацию кетокислот, причем повышенная активность АЛТ ведет к накоплению в среде пирувата, АСТ – к накоплению α-кетоглутарата, т.е. кетокислот, стимулирующих дыхание перитонеальных клеток (табл. 1). Таким образом, положительная связь дыхания перитонеальных клеток с активностью трансаминаз АЛТ и АСТ может объясняться поддержанием оптимальных для дыхательного метаболизма ПК концентраций кетокислот, в частности – пирувата и α-кетоглутарата.

Заключение

Pseudomonas aeruginosa способен стимулировать ответ перитонеальных клеток не только за счет своего эндотоксина – ЛПС, но также выделяемых из клеток бактерии трансаминаз АЛТ и АСТ. В действии АЛТ и АСТ на дыхание перитонеальных клеток проявляется стимулирующее влияние непосредственно на метаболический статус через концентрацию субстратов цикла Кребса – пирувата и α-кетоглутарата.

Список литературы

1. Влияние липополисахаридов различных изоляторов Pseudomonas aeruginosa на печень и перитонеальные клетки белых крыс / К.П. Габалов [и др.] // Известия Саратовского университета. Новая серия. Сер.: Химия. Биология. Экология. – 2011. – Вып. 2. С. 98–100.

2. Влияние трансаминаз на изменения интенсивности дыхания перитонеальных клеток морской свинки в ответ на БЦЖ in vitro / К.П. Габалов, М.Л. Малинин, Т.Н. Тарасенко [и др.] // Ветеринарная медицина домашних животных: Сборник статей. – Выпуск 7. – Казань: Печатный двор, 2010. – 308 с. – С. 94–97.

3. Камышников В.С. Справочник по клинико–биохимической лабораторной диагностике: В 2 т. Т. 1 / В.С. Камышников // Мн.: Беларусь. – 2000. – 495 с.

4. Лакин Г.Ф. Основы биометрии / Г.Ф. Лакин. – М.: Высшая школа – 1990. – С. 251–255.

5. Park B.H. Indefication and nitroblue tetrasolium reduction by neutrophils: 3 diagnostic act/ B.H. Park, S.M. Fikring // Lancet. –1968.– V. 11. – P. 532 – 534.

6. Wiegel J. Isolation of Lipopolysaccharides and the Effect of Polymyxin B on the Outer Membrane of Corynebacterium autotrophicum / J. Wiegel, F. Mayer// Archives of Microbiology. – 1978. – V. 118. – P. 67–69.

7. Guliy O.I., Bunin V.D., Ignatov O.V., et al. Effect of sulphanilamides on the electrophysical properties of microbial cells // Anti-Infective Agents. – 2014. – T. 12. № 2. – C. 191–197.

8. Staroverov S.A., Fomin A.S., MezhennyyP.V. , et al. The usage of phage mini-antibodies as a means of detecting ferritin concentration in animal blood serum // Journal of Immunoassay and Immunochemistry. – 2015. – V. 36. № 1. – P. 100–110.