

ОЦЕНКА ДЕЙСТВИЯ *BACILLUS THURINGIENSIS* НА СОСТОЯНИЕ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ТЕПЛОКРОВНЫХ ЖИВОТНЫХ

Е.Г. КЛИМЕНТОВА, М.С. ФЕКЛИНА

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 12-04-97016-р_поволжье_а.

КЛИМЕНТОВА Елена Георгиевна - доцент кафедры общей экологии ФГБОУ ВПО «Ульяновский государственный университет», кандидат биологических наук

ФЕКЛИНА Марина Сергеевна - старший преподаватель кафедры общей и биологической химии ФГБОУ ВПО «Ульяновский государственный университет», кандидат биологических наук

Адрес: ул. Архитектора Ливчака, 2, Ульяновск, РФ, 432000, Тел. 8(8422)27-24-64. E-mail: kloushel@mail.ru; morskaya81@list.ru

Ключевые слова: δ -эндотоксины, *Bacillus thuringiensis*, лимфоциты, моноциты, палочкоядерные и сегментоядерные нейтрофилы, эозинофилы, лейкоцитарный индекс интоксикации, теплокровные животные, мыши

В работе представлены результаты исследования действия δ -эндотоксинов энтомопатогенной бактерии *Bacillus thuringiensis* на количественный состав различных форм лейкоцитов крови и на значение лейкоцитарного индекса интоксикации теплокровных животных. Библиография: 6.

Актуальность исследования. Высокоспецифичные δ -эндотоксины (Cry и Cyt белки), образующиеся в процессе споруляции в клетках энтомопатогенной бактерии *B. thuringiensis*, являются основой ряда бактериальных инсектицидов и применяются во многих странах для защиты растений от насекомых-вредителей. Известно, что они являются практически безопасными для теплокровных животных и нецелевых насекомых [1]. В последние десятилетия появился ряд генетически модифицированных растений (ГМР), содержащих cry-гены, кодирующие токсинообразование, благодаря чему такие растения получили возможность синтезировать большие количества Cry белка, что защищает их от вредителей, но, в то же время, способно оказывать негативное воздействие на растительноядных животных [4]. Показано, что растворы Cry белка в достаточно высоких концентрациях (выше 50 мкг/мл) приводят к формированию дисбиотических изменений в кишечнике теплокровных животных [2]. Кроме того, попадая в организм животного, белок может всасываться в кишечнике и взаимодействовать с элементами крови.

Цель нашего исследования - оценка действия δ -эндотоксина *B. thuringiensis* на количественный состав форменных элементов крови и значение лейкоцитарного индекса интоксикации теплокровных животных.

Материалы и методы исследования. Кристаллы δ -эндотоксинов *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* штамм Z-52 получали, используя известные методики [5-6]. Готовили разведения кристаллов белков в 0,02 М фосфатном буфере. Растворы (1 мл) в дозе 25, 50 и 100 мг/кг веса вводили ежедневно перед кормлением *per os* с помощью зонда белым беспородным мышам в течение 42 суток. Животные контрольной группы получали аналогичное количество буферного раствора. В каждой группе было по 20 особей. Забор крови для исследования лейкоцитарной формулы у подопытных животных осуществляли через 1, 3 и 7 суток после начала опытов, а затем еженедельно. Кровь брали из хвостовой вены через 4 часа после кормления. Подсчет количества различных форм лейкоцитов в крови проводили, используя метод окрашивания мазка крови по Романовскому-Гимза с последующей микроскопией в световом микроскопе. Вычисляли лейкоцитарный индекс интоксикации (ЛИИ) по формуле, предложенной Я.Я. Кальф-Калифом [3]. Статистическую обработку полученных результатов проводили общепринятыми методами.

Результаты исследования и их обсуждение.

Абсолютное содержание лейкоцитов в периферической крови интактных мышей составило $7,8 \pm 1,3 \times 10^9$ /л (контроль).

Количественный анализ содержания лимфоцитов в периферической крови показал, что у животных, получавших δ -эндотоксины *B. thuringiensis* в дозе 25 и 50 мг/кг веса, не наблюдалось существенной разницы в их содержании относительно контроля, средние показатели - $4,77 \pm 1,8 \times 10^9$ /л и $6,16 \pm 2,8 \times 10^9$ /л, соответственно.

При действии δ -эндотоксинов в дозе 100 мг/кг веса было отмечено сначала незначительное увеличение количества лимфоцитов в периферической крови мышей к 7 суткам – в среднем $5,58 \pm 1,2 \times 10^9$ /л по сравнению с $4,68 \pm 1,1 \times 10^9$ /л – в контроле, а затем статистически значимое уменьшение этого показателя, максимум снижения был достигнут на 35 сутки и составил в среднем $2,8 \pm 0,1 \times 10^9$ /л, или уменьшилось на 40,1% (достоверность с контролем при $p < 0,05$).

Это позволяет сделать вывод о некотором угнетении клеточного иммунитета у теплокровных животных при действии длительного перорального введения δ -эндотоксинов *B. thuringiensis*.

Известно, что показатели белой крови у мелких грызунов более изменчивы, чем красной, и особенно сильно меняется количество лейкоцитов, которое зависит от различных физиологических причин и патологических процессов. Можно полагать, что индивидуальные колебания различных морфофизиологических показателей у самок мышей в связи с гормональной цикличностью будут выражены значительнее, чем у самцов. Поэтому при обсуждении данных эксперимента, кроме среднестатистических показателей, необходимо учитывать индивидуальные особенности каждого животного.

Средние данные по абсолютному содержанию моноцитов в крови мышей во всех группах в различные сроки эксперимента показали отсутствие достоверных отличий по сравнению с контролем.

Наблюдаемое повышение абсолютного числа сегментоядерных нейтрофилов в контроле с $1,9 \pm 0,2 \times 10^9$ /л в первые сутки эксперимента до $3,5 \pm 0,4 \times 10^9$ /л на 7-е сутки, а также в группах, где животные получали перорально токсин, с $2,9 \pm 0,3 \times 10^9$ /л до $4,25 \pm 0,5 \times 10^9$ /л, по-видимому, могло быть связано с неспецифической реакцией организма мышей на стресс, вызванный травмами при заборе крови, манипуляцией с зондом при введении растворов токсина или физиологического раствора (в контрольной группе), изъятием из клетки при кормлении и пр. В начале второй недели этот показатель стабилизировался и составлял в конце эксперимента в среднем $2,8 \pm 0,2 \times 10^9$ /л.

Показано отсутствие существенных изменений в показателях лейкоцитарного индекса интоксикации (ЛИИ) при воздействии растворов δ -эндотоксинов *B. thuringiensis* в дозах 25 и 50 мг/кг в крови экспериментальных групп животных по сравнению с контролем.

Резкое снижение количества лимфоцитов в крови животных, получающих растворы белков в дозе 100 мг/кг веса выявило значительное повышение показателя ЛИИ – с 0,10 до 0,48 по сравнению с контрольной группой на 14 сутки эксперимента и с 0,18 до 0,63 на 21 сутки. Оставаясь на достаточно высоком уровне в течение почти всего времени исследования, ЛИИ в среднем превышал контрольные показатели в 2,5 раза, что свидетельствует, по всей вероятности, о неспецифической иммунной реакции организма на чужеродный белок, способный проникать в кровоток. На 35 сутки ЛИИ в экспериментальных группах сравнился с контролем.

Таким образом, приведенные данные говорят об отсутствии ярко выраженного негативного влияния δ -эндотоксинов *B. thuringiensis* на количественный состав форменных элементов крови животных. Тем не менее, снижение числа лимфоцитов в крови животных при введении им растворов белков в дозе 100 мг/кг веса может свидетельствовать как о некотором угнетении клеточного иммунитета у теплокровных животных, связанного с неспецифической реакцией организма на белок, так и о начальной стадии токсического процесса, связанного с развитием дисбактериоза в кишечнике [2]. Снижение числа лимфоцитов в крови животных наблюдается также при действии веществ с цитостатическим действием, к которым можно отнести и белковые бактериальные токсины, в том числе и δ -эндотоксины *B. thuringiensis*.

ЛИТЕРАТУРА. 1. Киль В. И., Надькта В. Д. Генетически модифицированный картофель, устойчивый к колорадскому жуку// Агро XXI. - 2002. - № 1. - С. 12-15. 2. Климентова Е.Г., Купцова А.А., Каменек Л.К., Гулий В.В. Изменение микрофлоры толстого кишечника у мышей при длительном пероральном введении δ - эндотоксина *Bacillus thuringiensis* //Сельскохозяйственная биология. —2011. — №4. – С. 115-120. 3. Козинец, Г. И., Каюмова Д. Ф. Клетки периферической крови и экологические факторы// Клиническая лабораторная диагностика. - 1993. - № 1. - С. 14-20. 4. Юдина, Т.Г. О влиянии полифункциональных Сгу-белков, синтезируемых трансгенными растениями, на микробоценозы почв, растений, и животных//Тезисы Второй Международной научной конференции «Биотехнология – охране окружающей среды». – М.: Спорт и Культура, 2004. – С.157. 5. Юдина Т. Г. Антимикробная активность и экологическая роль белковых включений бактерий - представителей родов *Bacillus*, *Xenorhabdus*, *Photorhabdus* Дисс. докт. биол. наук.- Москва, 2006. – 87с. 6. Chestukhina G.G., Zalunin I.A., Kostina L.I., Kotova T.S. Crystal-forming proteins of *Bacillus thuringiensis*. Biochem. J., 1980, 187: 457-465.

UDC: 57.047: 579.852.11

EVALUATION OF δ -endotoxin *BACILLUS THURINGIENSIS* FOR CHANGE wbc BLOOD warm-blooded animals

Klimentova Elena - Associate Professor, Department of General Ecology FGBOU VPO "Ulyanovsk State University", PhD.

Street address. 2nd Lane. Narimanov, Building 10 kv.1, Ulyanovsk, Russia, 432030

Tel. 8 (8422) 272464, E-mail: kloushel@mail.ru

Feklina Marina S. - Senior Lecturer, Department of General and Organic Chemistry FGBOU VPO "Ulyanovsk State University", PhD.

Street address. St. Tyuleneva, 36 kv.170, Ulyanovsk, Russian Federation, 4320364

Tel: 89510940002, E-mail: morskaya81@list.ru

Keywords: δ -endotoxin *Bacillus thuringiensis*, lymphocytes, monocytes, stab and segmented neutrophils, eosinophils, leukocyte index of intoxication.

Abstract. The paper presents the results of a study of the δ -endotoxin entomopathogenic bacteria *Bacillus thuringiensis* on quantitative various forms of white blood cells and leukocyte intoxication index value of warm-blooded animals.

LITERATURE. 1. Keel V.I., Nadykta V.D. Genetically modified potatoes resistant to Colorado beetle // Agro XXI. - 2002. - № 1. - S. 12-15. 2. Klimentova E.G., Kuptsova A.A., Kamenek L.K., Guly V.V. Changes in the microflora of the large intestine of mice with long-term oral administration of δ -endotoxin *Bacillus thuringiensis* // Selskohozjastvennaya biologiya. - 2011. - № 4. - S. 115-120. 3. Kozinets G.I., Kayumova D.F. cells of peripheral blood and environmental factors // Clinicheskaya i laboratornaya diagnostika. - 1993. - № 1. - S. 14-20. 4. Yudina T.G. The effect of multifunctional Cry-proteins synthesized by transgenic plants on soil microbial, plant, and animal // Proceedings of the Second International Conference "Biotechnology - the protection of the environment." - Moscow: Sport and Culture, 2004. - P.157. 5. Yudina T.G. Antimicrobial activity and ecological role of protein inclusions of bacteria - the genera *Bacillus*, *Xenorhabdus*, *Photorhabdus* Diss. Doctor. biol. Science. - Moscow, 2006. - 87c. 6. Chestukhina G.G., Zalunin I.A., Kostina L.I., Kotova T.S. Crystal-forming proteins of *Bacillus thuringiensis*. Biochem. J., 1980, 187: 457-465.