

## АНТИОКСИДАТИВНИ МЕТАБОЛИЗАМ ПАЦОВА СОЈА WISTAR ИНФИЦИРАНИХ БАКТЕРИЈОМ *ESCHERICHIA COLI* У РАЗЛИЧИТОМ ПОСТАПЛИКАТИВНОМ ПЕРИОДУ

Јасна Фришчић, Маја Манојловић, Свјетлана Лолић, Радослав Декић, Биљана Кукавица

Универзитет у Бањој Луци, Природно-математички факултет, Младена Стојановића 2,  
Бања Лука

### Abstract

**FRIŠČIĆ, Jasna, Maја MANOJLOVIĆ, Svjetlana LOLIĆ, R. DEKIĆ, Biljana KUKAVICA: ANTIOXIDATIVE METABOLISM OF WISTAR RATS INFECTED WITH *ESCHERICHIA COLI* IN DIFFERENT POSTAPPLICATIVE PERIOD** [University of Banja Luka, Faculty of Natural Sciences and Mathematics, Mladena Stojanovića 2, 78000 Banja Luka]

Exotoxins and endotoxins produced by bacteria are important segment in pathogenesis of many diseases. These molecules have been the subject of many studies as a result of their potential role in the development of many human diseases (Rietschel, 1996). LPS is a molecule that is a constituent of outer membrane of the cell wall in Gram-negative bacteria. It represents one of the most powerful bacterial products which induces inflammatory response and causes tissue damage. Gram-negative septic shock is primarily triggered by this endotoxin. Complex organisms possess the ability to detect the presence of specific elements localized on pathogens, which normally do not occur in eukaryotes. Interaction between immune cells and LPS can be beneficial but also detrimental. LPS-induced macrophages are important for the elimination of bacterial infection, but also they represent main generators of ROS and RNS (Libby, 2007). Chronic exposure to LPS which causes prolonged production of anti-inflammatory mediators may eventually lead to oxidative stress (Hensley et al., 2000). In our study, Wistar rats were infected with *E. coli* (ATCC 11775). Bacterial suspension was administered intraperitoneally to both female and male animals of similar age and weight. We observed the effect of *E. coli* infection after incubation periods of 6 h and 12 hours. We analyzed the activity of superoxide dismutase and catalase in erythrocytes. No significant changes in SOD and CAT activity were observed after 6 hours of exposure. Catalase activity was increased after incubation period of 12 hours in both male and female rats. In normal physiological conditions, damaging effects of ROS are neutralized by antioxidant defense mechanism, creating prooxidant-antioxidant equilibrium. Our results suggest that *E. coli* treatment induces the antioxidant metabolism. Due to the fact that many diseases are mediated by oxidative stress, use of antioxidant enzymes can have enormous clinical significance.

**Key words:** Lypopolisaccharide, oxidative stress, superoxide dismutase, catalase

### Сажетак

Бактеријски егзо и ендотоксини значајни су у патогенези многих болести. Ове молекуле предмет су истраживања захваљујући њиховој потенцијалној улози у развоју многих болести код човјека (Rietschel, 1996). Ендотоксин липополисахарид (LPS) компонента је ћелијског зида бактерија и представља један од најмоћнијих бактеријских продуката који изазива инфламаторни одговор и оштећење ткива. Сматра се да је ендотоксин LPS примарни окидач Грам-негативног септичног шока. Виши организми имају способност да детектују присуство инфекције у организму препознајући специфичне елементе који се налазе на патогенима, који се нормално не

могу наћи код еукариотских организама. Интеракција између LPS и великог броја ћелија имуног система које су у стању да генеришу реактивне врсте може бити корисна или штетна. Макрофаги који су главни произвођачи ROS и RNS активирају се с циљем елиминације бактеријске инфекције кроз препознавање LPS које је веома значајно за домаћина (Libby, 2007). Међутим, дуготрајно излагање високим дозама LPS, које проузрокује пролонгирану продукцију антиинфламаторних медијатора, може узроковати стање оксидативног стреса (Hensley и сар., 2000). У овом раду пацови соја Wistar третирани су бактеријом *Escherichia coli*, сој ATCC 11775. Бактеријска суспензија убризгана је интраперитонеално, а третману су подвргнуте јединке оба пола, приближних маса и старости. У експерименту је посматран утицај *E. coli* у два постапplikативна периода, 6 и 12 часова. Анализирана је активност ензима антиоксидативне заштите еритроцита: супероксид дисмутазе и каталазе. Код експерименталних јединки нису уочене промјене активности SOD и CAT након 6 сати. Инкубациони период од 12 сати индуковао је статистички значајне промјене у активности каталазе код јединки оба пола. У нормалним физиолошким условима, штетно дејство ROS неутралише се дејством антиоксидативних одбрамбених система, стварајући равнотежу између прооксиданата и антиоксиданата. Наш рад показао је да третман експерименталних животиња доводи до стимулације антиоксидативног метаболизма. С обзиром на то да оксидативни стрес и оксидативна оштећења стоје у основи многих обољења, примјена антиоксидативних ензима може имати велики клинички значај.

**Кључне ријечи:** липополисахарид, оксидативни стрес, супероксид дисмутаза, каталаза

## УВОД

Бактерије посједују различите површинске антигене и врше секрецију много различитих фактора вируленције (токсина нпр.) који изазивају различите имунске одговоре. Бактеријски егзо и ендотоксини значајни су у патогенези многих болести. Ендотоксини су комплекси липопротеина високих молекулских маса који изграђују спољашњи дио ћелијског зида свих Грам-негативних бактерија (McCuskey, 1996). Ове молекуле предмет су истраживања захваљујући њиховој потенцијалној улози у развоју многих болести код човјека (Rietschel, 1996). Једна од основних одлика биолошких мембрана јесте асиметрична дистрибуција мембранских липида. Код Грам-негативних бактерија, спољашњи дио мембране састоји се углавном од липополисахарида. Ендотоксин липополисахарид (LPS) компонента је ћелијског зида бактерија и представља један од најмоћнијих бактеријских продуката који изазива инфламаторни одговор код домаћина и оштећење ткива. Сматра се да је ендотоксин LPS примарни окидач Грам-негативног септичног шока, системског синдрома који се карактерише неадекватном перфузијом органа и отказивањем рада виталних органа. Септички шок патолошко је стање чији је најизраженији симптом низак крвни притисак који прати мала количина крви која циркулише до виталних органа, посебно мозга, срца, бубрега и плућа. Вазодилатација и хипотензија представљају главни узрок оштећења ткива у септичном одговору. Они проузрокују смањено снабдијевање ткива кисеоником, а самим тим и одвијање анаеробног метаболизма (Aggarwal и сар., 2012). Интеракција између LPS и великог броја ћелија имуног система које су у стању да генеришу реактивне врсте могу да буду корисне или штетне. Макрофаги који су главни произвођачи ROS и RNS активирају се с циљем елиминације бактеријске инфекције кроз препознавање LPS које је веома значајно за домаћина (Libby, 2007). Међутим, дуготрајно излагање високим дозама

LPS, које проузрокује пролонгирану продукцију антиинфламаторних медијатора, може узроковати стање оксидативног стреса (Hensley и сар., 2000). Оксидативни стрес један је од најважнијих фактора који доприноси високој стопи морталитета. Везан је за неколико различитих обољења и потенцијално може водити ка LPS-индукованом септичном шоку (Victor и сар., 2004). Сматра се да ROS имају улогу у механизму токсичности LPS, посебно у активацији једарног фактора NF-κB. Реактивне врсте кисеоника представљају хемијски реактивне молекуле које садрже кисеоник. Неспарени електрони узрок су њихове високе и неселективне реактивности, односно способности да лако приме или отпусте електрон како би постигли стабилно стање. Настају као међупроизвод у току природних метаболичких процеса. Иако је њихов полуживот релативно кратак, у стању су да веома лако реагују са основним ћелијским биомолекулима, изазивајући промјене у структури и функцији ових једињења. Оксидативна оштећења играју веома важну улогу у септичном шоку индукованом од стране липополисахарида. Познато је да LPS доводи до повећане продукције ROS и RNS чија цитотоксичност на крају доводи до нарушавања рада органских система (Каумак и сарадници, 2011). Циљ овог рада је проучавање утицаја Грам-негативне бактерије *Escherichia coli* на елементе антиоксидативне заштите еритроцита пацова *Rattus norvegicus*, у различитом апликативном периоду. Организам мора да контролише присуство како оксиданата, тако и антиоксиданата. Помјерање равнотеже ка повећању прооксиданата које превазилази капацитет антиоксиданата дефинише се као оксидативни стрес и може да доведе до оксидативних оштећења. Овим експериментом желимо да испитамо да ли експериментална интраперитонеална инфекција пацова бактеријском суспензијом *E. coli* такође може да изазове оксидативни стрес и повећање концентрације слободних радикала у ћелијама. Као индикатори послужиле су нам активности ензима који су главни носиоци антиоксидативне заштите – супероксид дисмутаза (SOD, EC 1.15.1.1) и каталаза (CAT, EC 1.11.1.6).

## МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

Пацови су третирани бактеријом *Escherichia coli*, сој ATCC 11775. Број бактерија одређен је спектрофотометријски по стандардизованом поступку. Кориштена је бактеријска суспензија са CFU бројем (colony forming units)  $3 \times 10^7$ /ml. Животињама је убризгавано 0,2 ml бактеријске суспензије интраперитонеалним путем. Контролној групи животиња убризгавана је иста запремина физиолошког раствора. Првој експерименталној групи крв је извађена након 6 сати, а другој експерименталној групи након 12 сати. За извођење експеримента коришћени су лабораторијски пацови *Rattus norvegicus*, соја Wistar. Пацови су узгајани у лабораторијским условима на температури од 24 °C. Исхрана се састојала од стандардне дијете и воде *ad libitum*, са свјетлосним режимом 12 сати свјетла и 12 сати мрака. Анестезирање пацова вршено је интрамускуларном администрацијом кетамина (Ketamine hydrochloride – Rotexmedica, Germany). У овом експерименту кориштене су јединке мушког и женског пола, сличне старости и масе. Узорци крви узети су срчаном пункцијом.

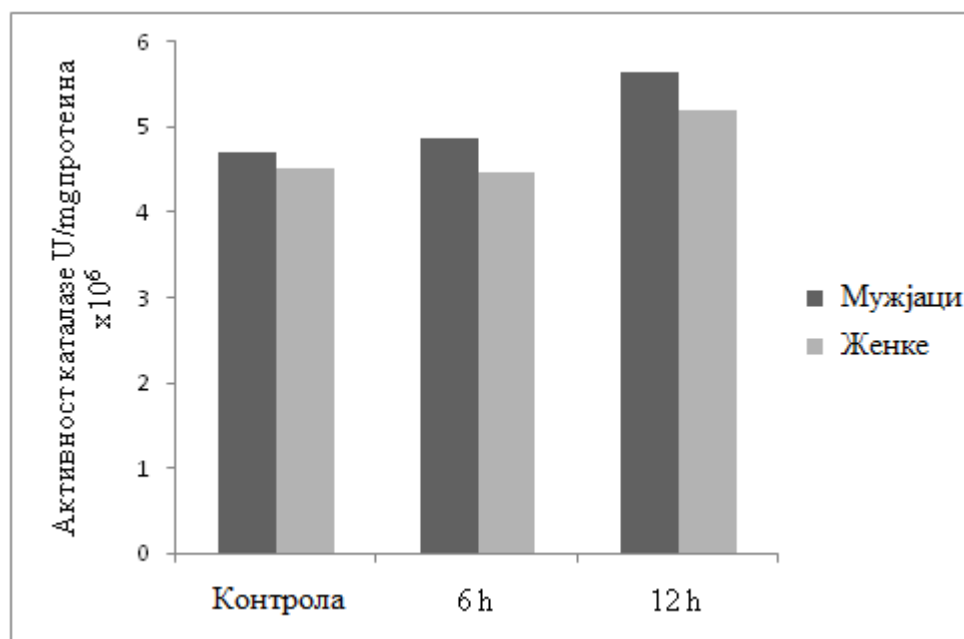
Узорци су центрифугирани на 2500 обртаја у минути и након центрифугирања, издвојени су плазма и леукоцити. Преостали талог еритроцита испиран је једнаком запремином физиолошког раствора три пута, а након сваког испирања слиједило је центрифугирање и одвајање супернатанта. Након хемолизирања на леду дестилованом

водом, узорци су до анализа чувани у замрзивачу на температури  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ . SOD фракција добијена је третирањем хемолизата етанолом (96%) и хлороформом. Мембране заостају у преципитату, а супернатант се користи као фракција за одређивање активности супероксид дисмутазе.

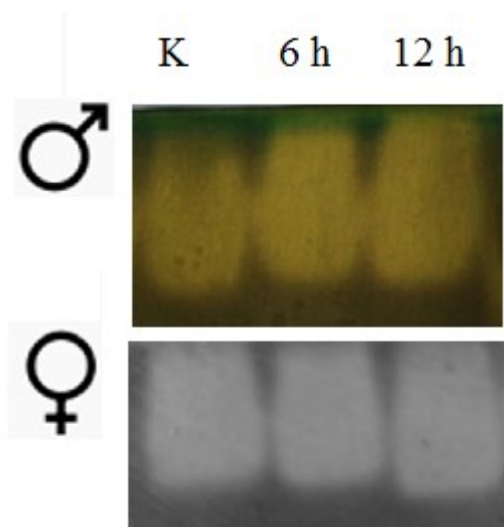
Концентрација протеина у узорцима одређена је методом по Lowry-у (1951). Активности супероксид дисмутазе и каталазе одређене су нативном полиакриламидном електрофорезом која је праћена специфичним бојењем. За одређивање активности каталазе употребљена је метода по Woodbury-у из 1971. године. Након завршене електрофорезе гелови су потопљени у раствор 1 %  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  и 1 %  $\text{FeCl}_3$ . За одређивање укупне активности SOD кориштено је специфично бојење према Fridovich-у и Beauchamp-у (1971). Гелови су након електрофорезе потопљени у раствор у чији састав улазе: NBT, TEMED, рибофлавин, EDTA и Tris HCl pH 7,8. Активности супероксид дисмутаза и каталазе одређене су дензитометријски помоћу софтверског програма Total Lab.

## РЕЗУЛТАТИ

Инкубациони период од 6 часова није довео до значајних промјена активности каталазе како код јединки мушког, тако ни код јединки женког пола. Након 12 часова излагања, активност каталазе код експерименталних јединки мушког пола повећала се 20% (Слике 1 и 2), док је овај проценат код јединки женког пола нешто нижи (15%).

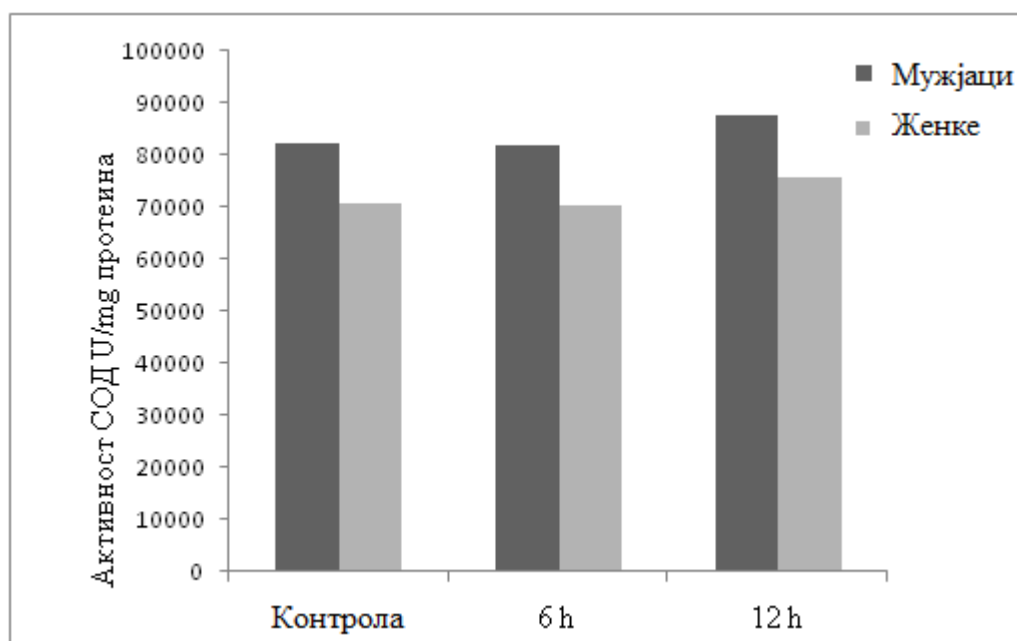


**Слика 1.** Активност каталазе у хемолизату контролних јединки оба пола, као и третираних јединки 6 и 12 часова након инфекције.

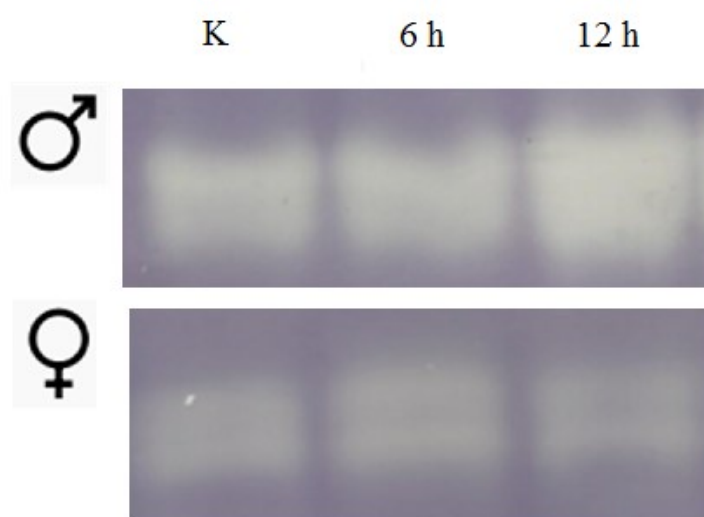


**Слика 2.** Активност каталазе детектована специфичним бојењем гелова нативне PAGE методом по Woodbury-у (1971).

Постапликативни период од 6 часова такође није индуковао значајне промјене активности супероксид дисмутазе. Тек након 12 сати од инокулације бактеријске суспензије могуће је уочити лагани раст активности супероксид дисмутаза код оба пола. Међутим активност се повећала тек за ~ 6% у односу на контролну групу јединки (Слике 3 и 4).



**Слика 3.** Активност SOD у узорцима контролних јединки оба пола, као и третираних јединки 6 и 12 часова након инфекције.



**Слика 4.** Активност SOD детектована специфичним бојењем гелова нативне PAGE методом по Fridovich-у и Beauchamp-у (1971).

## ДИСКУСИЈА

Познато је да се стање оксидативног стреса јавља код животиња изложених бактеријским ендотоксинима који изазивају експресију главних инфламаторних гена. Међутим, не постоји много података о ефектима оксидативног стреса који се јавља као последица инфекције Грам-негативним бактеријама. С друге стране, постоје многи радови који показују регулацију експресије гена изазвану ROS и RNS насталим третманом бактеријским компонентама *in vitro* (Feng и сар., 1995; Parmely, 1999; De Forge и сар., 1998). Можемо закључити да је нарушена редокс равнотежа карактеристична, како за ендотоксемију, тако и за инфекције Грам-негативним бактеријама. Према томе, оксидативни стрес може представљати важан фактор регулације инфламаторног одговора током сепсе (Taylor и сар., 1995). Многи радови доказују да LPS изазива повећање садржаја ROS и RNS у различитим ћелијама, од глијалних ћелија до макрофага, а најважнију улогу у њиховој елиминацији имају ензимски антиоксиданти (Marikovsky и сар., 2003; Wang и сар., 2004). LPS изазива оксидативни стрес индукцијом продукције проинфламаторних цитокина и реактивних врста кисеоника путем различитих механизма (Jaworek и сар., 2007). Организми су еволуцијом развили многе ензимске и неензимске антиоксиданте с циљем инхибиције стварања кисеоничних радикала. Иако у еритроцитима постоји читав низ различитих антиоксиданата, најважнију улогу у антиоксидативној одбрани имају SOD и CAT. Каталаза, поред супероксид дисмутазе представља прву линију одбране од антиоксидативних оштећења. Након инкубационог периода од 6 часова, није уочена значајна промјена активности каталазе еритроцита третираних животиња. Међутим, након 12 часова од третмана, уочен је раст активности каталазе код јединки оба пола, са нешто већим интензитетом код јединки мушког пола (Слике 1 и 2). Каталаза функционише ефикасно само када је присутна релативно висока концентрација водоник-пероксида, док се ниске концентрације пероксида разлажу дејством глутатион пероксидаза. Ефикасна је у условима повећаног оксидативног стреса, а посебно у случају ограниченог садржаја глутатиона и смањене активности GP<sub>x</sub>

(Wassmann и сар., 2004). Супероксид дисмутаза, у физиолошким условима, елиминише супероксидне радикале настале у стању оксидативног стреса. У еритроцитима је за дисмутацију одговорна Cu-Zn SOD која се налази у цитоплазми (Fridovich, 1975). Наш експеримент није показао значајне промјене активности цитосолне SOD (Слике 3 и 4) након примјене краћих инкубационих периода (6 и 12 часова). Kerr и сар., (1988) у свом су раду показали да продукција супероксидних радикала може довести до индукције, али и инхибиције активности SOD. Инхибирањем активности каталазе у еритроцитима, долази до акумулације водоник-пероксида, који инхибира активност супероксид дисмутаза (Bukowska и сар., 2003).

Активности SOD и CAT често се користе као биоиндикатори продукције ROS (Zelikoff и сар., 1996). Повишени ниво антиоксидативних ензима може да настане као резултат потребе за детоксикацијом продуката који су производ оксидативног стреса.

## ЗАКЉУЧАК

Реактивне врсте кисеоника укључене су у раст, развој, диференцијацију, али и смрт ћелије. Њихове ниске концентрације могу да имају позитиван, незамјенљив утицај на различите процесе као што су преношење сигнала и антимикуробна заштита. Међутим, повећање њиховог садржаја везује се за процесе старења као и за настанак великог броја болести, укључујући карцином, исхемију, пад имунитета и ендокриних функција. Активности ензима антиоксидативне заштите могу да се користе као биоиндикатори оксидативног стреса. С обзиром на то да оксидативни стрес и оксидативна оштећења стоје у основи многих обољења, примјена антиоксидативних ензима може имати велики клинички значај.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Aggarwal, S., Dimitropoulou, C., Lu, Q., Black, S. M. Sharma, S. : Glutathione supplementation attenuates lipopolysaccharide-induced mitochondrial dysfunction and apoptosis in a mouse model of acute lung injury. *Frontiers in Physiology*, 3, 161, 2012.
2. Beauchamp, C., Fridovich, I. (1971): Superoxide dismutase: Improved assays and assay applicable to acrylamide gels. *Analytical biochemistry*, 44, 276–287, 1971.
3. De Forge, L. E., Preston, A. M., Takeuchi, E., Kenney, J., Boxer, L. A., Remick, D. G. : Regulation of interleukin 8 gene expression by oxidant stress. *Journal of Biological Chemistry*, 268, 25568–25576, 1993.
4. Feng, L., Xia, Y., Garcia, G. E., Hwang, D., Wilson, C. G. : Involvement of reactive oxygen intermediates in cyclooxygenase-2 expression induced by interleukin-1, tumor necrosis factor- $\alpha$ , and lipopolysaccharide. *Journal of Clinical Investigations*, 95, 1669–1675, 1995.
5. Fridovich, I. : Superoxide dismutase. *Annual Review in Biochemistry*, 44, 147–159, 1975.
6. Hensley, K., Robinson, K.A., Gabbita, S.P., Salsman, S., Floyd, R.A. : Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury. *Free Radical Biology and Medicine*, 28, 1456–1462, 2000.

7. Jaworek, J., Konturek, S.J., Macko, M., Kot, M., Szklarczyk, J., Leja Szpak, A., Nawrot-Porabka, K., Stachura, J., Tomaszewska, R., Siwicki, A., Pawlik, W. W. : Endotoxemia in newborn rats attenuates acute pancreatitis at adult age. *Journal of Physiological Pharmacology*, 58, 131–147, 2007.
8. Kaymak, C., Basar, H., Sardas, S. : Reactive Oxygen Species (Ros) Generation in Sepsis. *FABAD Journal of Pharmacological Science*, 36, 41–47, 2011.
9. Kerr, J. S., Boswell, G., Ackerman, N., and Stevens, T. : Induction of Superoxide Dismutase Activity by Paraquator Edu in Human Gingival Fibroblasts. *Basic Life Sciences*, 49, 695–698, 1988.
10. Libby, P. : Inflammatory mechanisms: the molecular basis of inflammation and disease. *Nutrition Reviews*, 65, 140–146, 2007.
11. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. : Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265–275, 1951.
12. Marikovsky M, Ziv V, Nevo N, Harris-Cerruti C, Mahler O. : Cu/Zn superoxide dismutase plays important role in immune response. *Journal of Immunology*, 170, 2993–3001, 2003.
13. McCuskey, R., Urbaschek, R., Urbaschek, B. : The microcirculation during endotoxemia. *Cardiovascular Research*, 32, 752–763, 1996.
14. Parmely, M. J. : Nitric oxide as a signaling molecule in the systemic inflammatory response to LPS. in Endotoxin in health and disease. eds Brade H., Morrison D., Opal S., Vogel S. Marcel Dekker, New York, 1999.
15. Rietschel, E., Holst, O., Brade, L., Muller-Loennies, S., Mamat, U., Zahringer, U., Beckmann, F. : Bacterial endotoxin: chemical constitution, biological recognition, host response, and immunological detoxification. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 216, 39–81, 1996.
16. Taylor, D.E., Piantadosi, C.A. : Oxidative metabolism in sepsis and sepsis syndrome. *Journal of Critical Care*, 10 (3), 122–135, 1995.
17. Victor, V.M., Rocha, M., De la Fuente, M. : Immune cells: free radicals and antioxidants in sepsis. *International Immunopharmacology*, 4, 327–347, 2004.
18. Wang, T., Qin, L., Liu, B., Liu, Y., Wilson, B., Eling, T.E., Langenbach, R., Taniura, S., Hong, J.S. : Role of reactive oxygen species in LPS-induced production of prostaglandin E2 in microglia. *Journal of Neurochemistry*, 88 (4), 939–47, 2004.
19. Wassmann, S., Wassmann, K. Nickenig G. : Modulation of oxidant and antioxidant enzyme expression and function in vascular cells. *Hypertension*, 44, 381–386, 2004.
20. Woodbury, W., Spenser, A. K., Stahmann, M. A. : An improved procedure using ferricyanide for detecting catalase isoenzymes. *Annals of Biochemistry*, 41, 301-305, 1971.
21. Zelikoff, J. T., Wang, W., Islam, N., Twerdok, L. E., Curry, M., Beaman, J., Flescher, E.: Assays of reactive oxygen intermediates and antioxidant enzymes: potential biomarkers for predicting effects of environmental pollution In: Ostrander, G.K. (Ed.), *Techniques in Aquatic Toxicology*, Lewis Publishers, 287–306., 1996.

Примљено: 07.12.2015.

Одобрено: 20.04.2016.