

Stanisław Zaremba*, Maria Banach*, Andrzej Pierściński*

Zaburzenia w metabolizmie węglowodanowym u myszy po dootrzewnowym podaniu lektyny z zarodków pszennych (WGA)

Streszczenie

Lektynę z *Triticum vulgare* (*wheat germ agglutinin-WGA*) podawano dootrzewnowo myszom w jednorazowej dawce 30 mg/kg wagi ciała.

Poziom glukozy w krwi oraz glikogenu w wątrobie i mięśniach badano po upływie 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120 oraz 144 godzin od momentu wprowadzenia WGA.

Generalnie należy stwierdzić, że podawana lektyna znacznie zaburza gospodarkę węglowodanową w organizmie zwierzęcym, o czym świadczy znaczne obniżenie poziomu cukru w krwi oraz wątrobie i mięśniach już po upływie 12 godzin od jej wprowadzenia.

Chwiejność poziomu glukozy oraz glikogenu wykazano u zwierząt wszystkich grup doświadczalnych, o czym świadczy występowanie minimum i maksimum koncentracji w badanych tkankach.

Wstęp

Lektyny są białkami, które mają zdolność wiązania się ze specyficznymi cukrami występującymi w postaci monosacharydów, czy też obecnych w polisacharydach, glikoproteidach oraz glikolipidach. Wiązanie się lektyn z pewnymi komponentami błon komórkowych (receptorami lektynowymi) w sposób odwracalny czyni z nich użyteczne narzędzie w badaniach struktury i funkcji błon komórkowych (Kinzel i wsp. 1977, Guy i wsp. 1979).

* Zakład Fizjologii Zwierząt Uniwersytetu Jagiellońskiego.

Perturbacje wywołane na powierzchni komórek – spowodowane wiązaniem lektyn – mogą inicjować szereg zmian w aktywności tych komórek (Grunspan-Swirsky i Pick 1979, Kurisu i wsp. 1980, Vaillier i Vaillier 1980) lub do ich podziału (Hedekov 1968, Romeo i wsp. 1978, Speckart i wsp. 1978).

Stymulujące działanie lektyn na komórki wiąże się z ich właściwościami mitogennymi i najczęściej wykorzystywane jest w badaniach *in vitro*, natomiast niewiele nadal wiadomo o zmianach wywołanych lektynami w warunkach *in vivo*.

W związku z tym, że lektyny roślinne wchodziły w skład pożywienia tak zwierząt, jak i ludzi, podjęto badania nad ewentualnymi skutkami ich oddziaływania w przewodzie pokarmowym, co doprowadziło do stwierdzenia szeregu zmian histopatologicznych (Pusztai i wsp. 1986, Sjölander i wsp. 1984).

Zaburzenia w metabolizmie węglowodanowym pod wpływem lektyn podanych drogą pozajelitową i pokarmową były przedmiotem naszych dotychczasowych badań (Banach i wsp. 1983, Gwóźdź i wsp. 1987, Zaremba i wsp. 1987, Zaremba i wsp. 1990).

Lektyna z zarodków pszennych (*wheat germ agglutinin* – *WGA*) wykazuje specyfikę do wiązania N-acetylo-D-glukozaminy oraz kwasu sialowego (Clevers i wsp. 1986) i uważana jest przez niektórych badaczy za czynnik niemitogeny, a nawet antymitogeny w stosunku do ludzkich limfocytów (Boldt i wsp. 1975). Jednakże wyniki badań Gordon i wsp. (1980), Greene i wsp. (1981), Reed i wsp. (1985) oraz Taylor i wsp. (1985) wskazują na stymulację przez *WGA* syntezy DNA, jak również zwiększoną produkcję interleukiny 2 (Il-2) w hodowlach ludzkich komórek mononuklearnych z krwi obwodowej.

Biorąc pod uwagę szeroki zakres możliwości działania lektyn w warunkach *in vitro* oraz *in vivo* postanowiliśmy prześledzić wpływ *WGA* – podanej drogą pozajelitową – na metabolizm węglowodanowy u myszy.

Material i metody

Badania przeprowadzono na 90 myszach, 6 tygodniowych samcach szczepu Swiss, o ciężarze ciała od 28 do 32 g, pochodzących z hodowli Zakładu Fizjologii Zwierząt UJ.

Zwierzętom podawano standaryzowaną paszę typu Murigran oraz wodę *ad libitum* i utrzymywano w określonym reżimie świetlnym (12 h światło i 12 h ciemno).

Z badanych zwierząt wyodrębniono grupę kontrolną oraz 8 grup doświadczalnych (po 10 osobników każda), w zależności od czasu pobierania materiału, tj. po upływie 6 h (I grupa), 12 h (II grupa), 24 h (III grupa), 48 h (IV grupa), 72 h (V grupa), 96 h (VI grupa), 120 h (VII grupa) oraz 144 h (VIII grupa) od momentu podania lektyny.

Zwierzętom grup doświadczalnych wprowadzano dootrzewnowo jednorazową dawkę lektyny z *Triticum vulgare* (WGA – *wheat germ agglutinin*; Sigma Chemical Company, L-9640) w ilości 30 mg/kg wagi ciała w 0.4 ml soli fizjologicznej, podczas gdy zwierzętom grupy kontrolnej podawano analogicznie 0.4 ml 0.9% NaCl. Zwierzęta uśmiercano przez dyslokację rdzenia kręgowego. Celem ilościowego oznaczenia poziomu glukozy we krwi, jak również glikogenu w wątrobie i mięśni szkieletowym, zastosowano metodę antronową (Seifter i wsp. 1950). Pomiaru kolorymetrycznego dokonywano na spektrofotometrze firmy Zeiss, przy długości fali 620 nm.

Zawartość glukozy we krwi podawano w milimolach/litr (mM/l), a w przypadku glikogenu obliczano ekwiwalent glukozy w tkankach i podawano w mikromolach/g świeżej tkanki (μ M/g). Używane zatem w tekście określenia 'poziom glikogenu' należy rozumieć jako poziom glukozy w badanym narządzie.

Wyniki badań

Zawartość glukozy w krwi (tab. 1, ryc. 1).

U zwierząt kontrolnych poziom glukozy wynosi 11.94 mM/l; po dootrzewnowym wprowadzeniu WGA stwierdzono statystycznie istotne różnice w poziomie badanego cukru u zwierząt większości grup doświadczalnych. Największy spadek poziomu glukozy odnotowano po upływie 12 h (grupa II – 7.89 mM/l), zaś najwyższy poziom odnotowano po upływie 48 h (grupa IV – 13.38 mM/l). U zwierząt doświadczalnych grup VI, VII i VIII (tj. po upływie 96, 120 oraz 144 h od podania WGA) uzyskane wyniki nie odbiegały istotnie od wartości grupy kontrolnej.

Tab. 1. Średnia zawartość glukozy we krwi oraz glikogenu w wątrobie i mięśniu szkieletowym po podaniu WGA

Grupa	Czas po iniekcji godz.	Średni ciężar ciała g		Zawartość glukozy mM/l	Zawartość glikogenu w μ M glukozy/g świeżej tkanki	
		przed iniekcją	przed zabiciem		Wątroba	Mięsień szkieletowy
Grupa kontrolna		–	29,4	11,94 +/- 0,89	170,5 +/- 34,25	22,41 +/- 3,32
I	6	27,8	27,8	8,27 +/- 1,23x	73,4 +/- 16x	34,95 +/- 5,65x
II	12	31,5	29,7	7,89 +/- 1,45x	56,89 +/- 21,83x	11,82 +/- 1,26x
III	24	32	29,6	10,24 +/- 1,13x	227,49 +/- 53,46x	17,96 +/- 2,24x
IV	48	26,3	24,2	13,38 +/- 0,88x	151,19 +/- 24,93	19,55 +/- 2,39x
V	72	28,7	29	10,88 +/- 1,24x	162,13 +/- 30,89	13,65 +/- 2,37x
VI	96	33,5	31,1	11,27 +/- 2,15	168,99 +/- 34,45	20,78 +/- 6,64
VII	120	31,6	33	11,4 +/- 1,02	178,27 +/- 18,47	11,34 +/- 1,08x
VIII	144	30,6	33	11,45 +/- 1,17	270,57 +/- 32,95x	11,45 +/- 1,16x

x p < 0,05

Zawartość glikogenu w wątrobie (tab. 1, ryc. 2).

W porównaniu z grupą kontrolną (170.5 $\mu\text{M/g}$) stwierdzono statystycznie istotne różnice u zwierząt 4 grup doświadczalnych. I tak – już po upływie 6 godzin od iniekcji WGA (grupa I) poziom glikogenu gwałtownie spada (73.4 $\mu\text{M/g}$), osiągając minimum koncentracji po upływie 12 h (grupa II), tj. 56.89 $\mu\text{M/g}$.

Gwałtowny wzrost zawartości glikogenu – przekraczający znacznie wartość kontrolną – odnotowano w 2 punktach czasowych, tj. po upływie 24 h (grupa III – 227.49 $\mu\text{M/g}$) oraz 144 h (grupa VIII – 270.57 $\mu\text{M/g}$).

U zwierząt pozostałych grup doświadczalnych uzyskane wartości nie wykazują istotności statystycznej.

Zawartość glikogenu w mięśniu szkieletowym (tab. 1, ryc. 3).

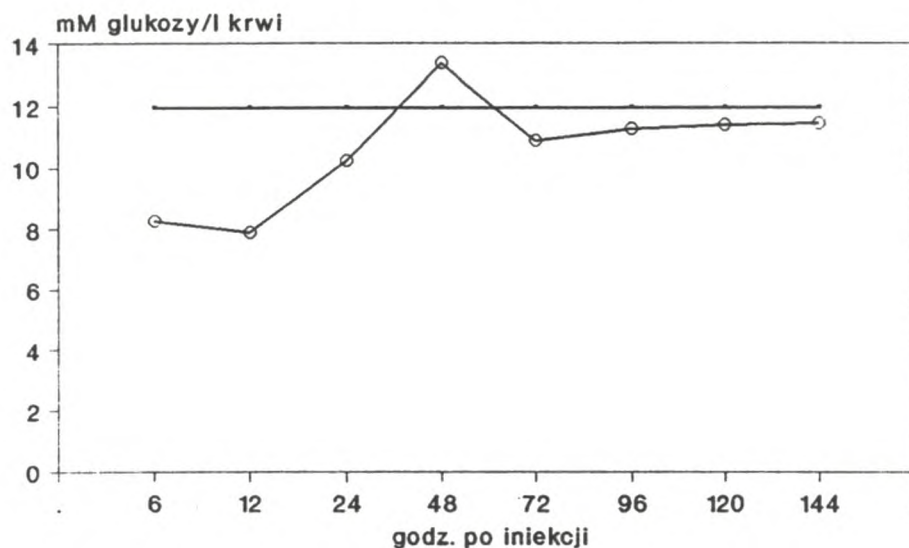
Analizując poziom glikogenu mięśniowego wykazano statystycznie istotne zmiany prawie we wszystkich grupach doświadczalnych (wyjątek stanowi grupa VI).

W porównaniu z grupą kontrolną (22.41 $\mu\text{M/g}$) odnotowano znaczny wzrost zawartości glikogenu po upływie 6 godzin (grupa I – 34.94 $\mu\text{M/g}$), następnie po 12 h obniżenie o połowę w stosunku do wartości kontrolnej (11.82 $\mu\text{M/g}$ – grupa II).

U zwierząt kolejnych grup, tj. po 24 i 48 h (grupy III i IV) odnotowano tendencję wzrostową, przy czym uzyskane wartości utrzymują się poniżej poziomu kontrolnego (odpowiednio 17.96 $\mu\text{M/g}$ oraz 19.55 $\mu\text{M/g}$). W następnych badanych punktach czasowych, tj. po upływie 72 h (grupa V) odnotowano spadek zawartości glikogenu do 13.65 $\mu\text{M/g}$ oraz wzrost poziomu po 96 h od iniekcji WGA (grupa VI – 20.78 $\mu\text{M/g}$).

Kolejny gwałtowny spadek w poziomie badanego cukru wykazano po upływie 120 h (grupa VII – 11.34 $\mu\text{M/g}$) oraz 144 h (grupa VIII – 11.45 $\mu\text{M/g}$).

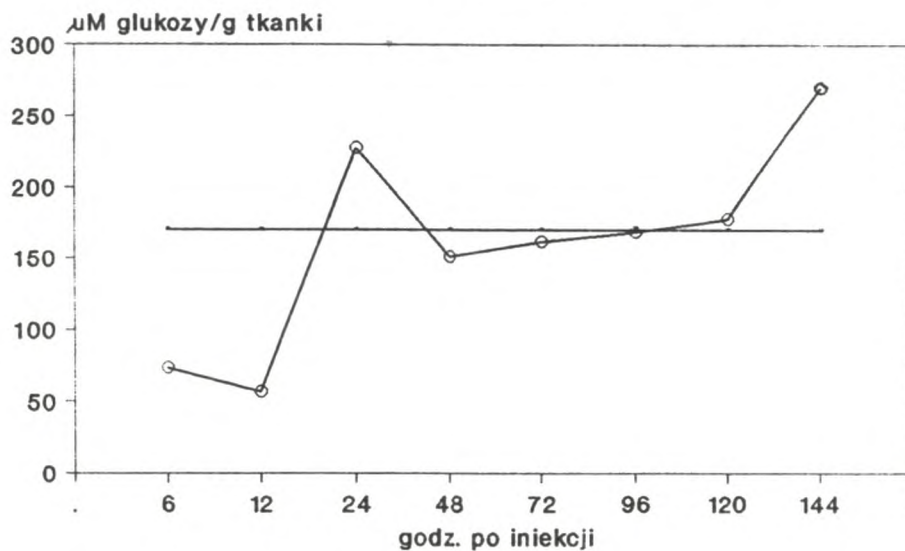
Zawartość glukozy w krwi



Ryc. 1.

— Kontrola ○ WGA

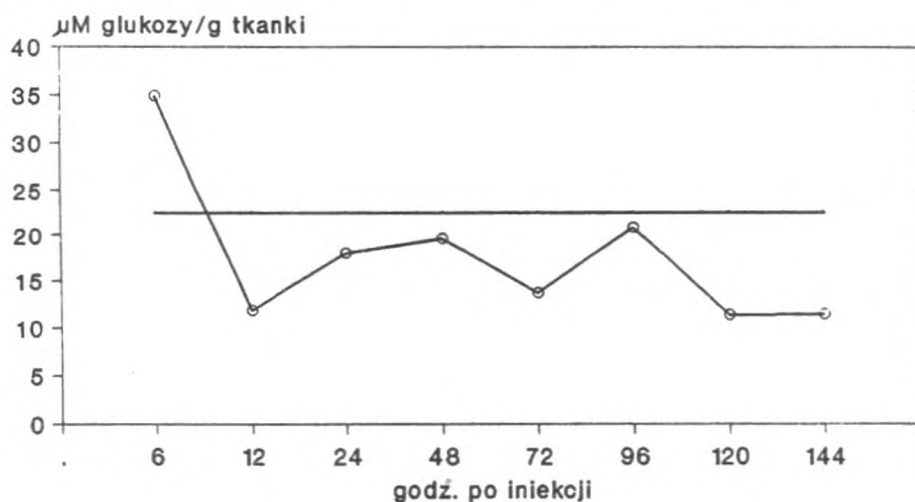
Zawartość glikogenu w wątrobie



Ryc. 2.

— Kontrola ○ WGA

Zawartość glikogenu w mięśniach szkieletowych



Ryc. 3.

— Kontrola ○ WGA

Dyskusja

WGA podawana zwierzętom dootrzewnowo zaburza w istotny sposób gospodarkę węglowodanową ustroju, o czym świadczą wyniki zestawione w tabeli 1.

Generalnie należy stwierdzić, że WGA powoduje spadek poziomu glukozy we krwi oraz glikogenu w wątrobie i mięśniach. Stąd też wartości uzyskane po 12 h od iniekcji lektyny (grupa II) są najniższe ze wszystkich uzyskanych i stanowią minimum koncentracji badanego cukru. U zwierząt pozostałych grup doświadczalnych wykazano znaczną chwiejność poziomu glukozy we krwi oraz glikogenu w tkankach.

Oprócz wspomnianego już minimum koncentracji glukozy oraz glikogenu uzyskano również wartości znacznie przewyższające poziom kontrolne (maksimum koncentracji) – dla krwi po 48 h (grupa IV), dla wątroby po

24 h oraz 144 h (grupy III i VIII), natomiast dla mięśni po 6 h (grupa I) od wprowadzenia lektyny.

Na podkreślenie zasługuje fakt, że jedynie we krwi poziom glukozy osiąga stabilizację począwszy od 96 h (grupa VI), podczas gdy w mięśniach zawartość glikogenu nie osiąga poziomu uzyskanego w grupie kontrolnej (wyjątek stanowi grupa I tj. 6 h od iniekcji WGA).

Wyniki uzyskane w niniejszej pracy znajdują potwierdzenie we wcześniejszych badaniach nad wpływem niektórych lektyn na gospodarkę cukrową myszy, tj. lektyny z *Robinia pseudoaccacia* – RpA (Banach i wsp. 1983), konkanawaliny – Con A (Gwóźdź i wsp. 1987) oraz lektyny z zarodków pszennych – WGA (Zaremba i wsp. 1990). Wykazano bowiem istotne zaburzenie w metabolizmie węglowodanów, co przejawiało się znaczną chwiejnością w poziomie glukozy we krwi oraz glikogenu w tkankach badanych zwierząt.

Porównując zatem efekty działania WGA z innymi lektynami, np. PHA (lektyna z *Phaseolus vulgaris*), Con A, czy też RpA można stwierdzić, że powodują w organizmie zwierzęcym podobne skutki. Różnice w ich oddziaływaniu polegają jedynie na przesunięciu w czasie tzw. minimum koncentracji cukru w badanych tkankach oraz stopnia zmian w jego koncentracji.

Jak wykazały liczne badania *in vitro*, nieodzownym warunkiem oddziaływania lektyn jest ich związanie się z receptorami powierzchniowymi komórek (receptorami lektynowymi). Wiązanie to powoduje pewne zmiany w strukturze błony komórkowej, wyzwalając szereg zmian w metabolizmie, na co zwrócili uwagę Hedeksov (1968) oraz Rossi i Zatii (1968).

Z badań Cuatrecasas i Tell (1973) wiadomo, że ilość związanej przez komórki lektyny zależy może od ilości receptorów lektynowych lub ilości lektyny wprowadzonej do organizmu, bądź też medium hodowlanego, z czym wiążą się późniejsze skutki jej oddziaływania. I tak – niskie stężenia Con A i WGA działają wyraźnie insulinopodobnie i mitogennie, wyższe zaś (powyżej 50 µg/ml) blokują receptory insulinowe.

Należy dodać, że w przypadku badań prowadzonych *in vitro* można z dużą dokładnością określić relacje ilościowe lektyn do komórek, natomiast w badaniach *in vivo* jest to wręcz niemożliwe z uwagi na różnorodną aktywność lektyny, zróżnicowane powinowactwo do komórek czy tkanek, jak również ze względu na obecność inhibitorów lektynowych w płynach tkankowych.

Jeśli chodzi o wpływ WGA na metabolizm węglowodanów *in vivo* brak – jak dotąd – danych w piśmiennictwie naukowym. Z badań *in vitro* wiadomo

jedynie, że WGA wykazuje działanie insulinopodobne w izolowanych hepatoocytach oraz komórkach tłuszczowych wątroby, ze względu na możliwość bezpośredniego wiązania się z receptorami insulinowymi tych komórek (Cuatrecasas i Tell, 1973). Uwzględniając zatem powyższe fakty nie można wykluczyć identycznego oddziaływania WGA na metabolizm węglowodanowy w organizmach badanych zwierząt.

Jak wynika z nielicznych badań, pewne lektyny (np. Con A) oprócz specyficznego działania mogą dodatkowo wykazywać działanie toksyczne, co stwierdzono zarówno w badaniach *in vitro* oraz *in vivo*, przy czym stopień toksyczności uzależniony jest w dużej mierze od wielkości dawki (Nirmul i wsp. 1972).

Z badań Sjölander i wsp. (1984) wynika, że WGA należy do lektyn działających destrukcyjnie na nabłonek jelita, wiążąc się bezpośrednio z receptorami komórek nabłonka jelitowego. Stąd wydaje się prawdopodobne, że podawana pozajelitowo może działać również destrukcyjnie na pewne komórki, czy też tkanki, co należałoby wyjaśnić w dalszych badaniach.

Wydaje się przeto, że stwierdzone w niniejszej pracy zaburzenia w metabolizmie węglowodanów są wypadkową wielokierunkowego działania WGA w organizmie myszy.

Oceniając zatem zmiany wywołane oddziaływaniem lektyn w organizmie zwierzęcym należałoby zawsze uwzględniać ich efekt hypoglikemiczny, co może mieć istotne znaczenie w zrozumieniu mechanizmu indukowanych zmian.

Literatura

- Boldt D.H., Macdermott R.P., Jorolan O., 1975, *Interaction of plant lectins with purified human lymphocyte populations: binding characteristics and kinetics proliferation*. J. Immunol. 114, 1532.
- Banach M., Zaremba S., Sadowska M., 1983, *Disturbances of liver and muscle glycogen level as well as blood glucose level in mice following administration of lectin extracted from Robinia pseudoaccacia L.* Folia Biol. (Kraków). 31, 177–186.
- Clevers H.C., De Bresser A., Kleinveld H., Gmeling-Meyling F.H.J., Ballieux R.E., 1986, *Wheat germ agglutinin activates human T lymphocyte by stimulation of phosphoinositide hydrolysis*. J. Immunol. 136, 3180–3183.

- Cuatrecasas P., Tell G.P., 1973, *Insulin-like activity of Concanavalin A and wheat germ agglutinin – direct interaction with insulin receptors*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 70, 485–489.
- Gordon L.K., Hamill B., Parker C.W., 1980, *The activation of blast transformation and DNA synthesis in human peripheral blood lymphocytes by wheat germ agglutinin*. J. Immunol. 125, 814.
- Greene W.C., Goldman C.K., Marshall S.T., Fleischer T.A., Waldman T.A., 1981, *Stimulation of immunoglobulin biosynthesis in human B cells by wheat germ agglutinin*. J. Immunol. 127, 799.
- Grunspan-Swirsky A., Pick E., 1979, *Facilitation of adenylate cyclase stimulation in macrophages by lectin*. Cell immunol. 45, 415–427.
- Guy D., Latner A.L., Turner G.A., 1979, *A simple lectin-mediated cell-adhesion method for investigating the cell surface*. Exp. Cell Biol. 47, 312–319.
- Gwózdź H., Banach M., Zaremba S., 1987, *Effect of concanavalin A on the glucose content in the blood and the glycogen content in the liver and muscles*. Folia Biol. (Kraków). 35, 179–188.
- Hedekov C.J., 1968, *Early effects of phytohaemagglutinin on glucose metabolism of normal human lymphocytes*. Biochem. J. 1110, 373–380.
- Kinzel U., Richards J., Kübler D., 1977, *Lectin receptors sites at the cell surface employed for affinity separation of tissue culture cells*. Exp. Cell Res. 105, 89–400.
- Kurisu M., Yamazaki M., Mizuno D., 1980, *Induction of macrophage-mediated tumor lysis by the lectin wheat germ agglutinin*. Cancer Res. 40, 3798–3803.
- Nirmul G., Severin C., Taub R.N., 1972, *In vivo effects of concanavalin A. I. Immunosuppressive effects*. Transplantation, 14, 91–95.
- Pusztai A., Grant G., de Oliveira J.T.A., 1986, *Local (gut) and systemic responses to dietary lectins*. IRCS Med. Sci. 14, 205–208.
- Reed J.C., Robb R.J., Greene W.C., Nowell P.C., 1985, *Effect of wheat germ agglutinin on the interleukin pathway of human T lymphocyte activation*. J. Immunol. 134–314.
- Romeo D., Zabucchi G., Jug M., Miani N., Soranzo M.R., 1978, *Metabolic stimulation of polymorphonuclear leucocytes: effect of tetravalent and divalent concanavalin A*. J. Membrane Biol. 44, 321–330.
- Rossi F., Zatti M., 1968, *Mechanism of the respiratory stimulation in saponin treated leucocytes. The KCN insensitive oxidation of NADPH*. Biochim. Biophys. Acta. 153, 296.
- Seifter S., Dayton S., Novic B., Muntwyler E., 1950, *The estimation of glycogen with the anthrone reagent*. Arch. Biochem. 25, 191–200.

- Sjölander A., Magnusson K.E., Latkovic S., 1984, *The effect of concanavalin A and wheat germ agglutinin on the ultrastructure and permeability of rat intestine*. Int. Archs. Allergy appl. Immun. 75, 230–236.
- Speckart S.F., Boldt D.H., Reyerson K.L., 1978, *Different effects of concanavalin A and E-phytohemagglutinin upon lymphocyte glycosyltransferase activities*. Cancer Res. 38, 4554–4561.
- Taylor D.S., Reed J.C., Nowell P.C., 1985, *Stimulation and inhibition of human T cells subsets by wheat germ agglutinin*. J. Immunol. 134, 3756.
- Vaillier J., Vaillier D., 1980, *ANS fluorescence and electrokinetic potential of activated lymphocytes by Con. A or LPS in vivo*. Life Sci. 27, 1359–1370.
- Zaremba S., Gwózdź H., Banach M., 1987, *Effect of lectin from Phaseolus vulgaris (PHA-M) on the glucose content in the blood and the content of glycogen in the mouse liver and muscles*. Folia Biol. (Kraków). 35, 3–12.
- Zaremba S., Banach M., Pierściński A., 1990, *Effect of wheat germ agglutinin (WGA) on serum glucose and glycogen contents in liver and muscles of mouse*. Acta Biol. Cracoviensia. 32, 46–51.

Stanisław Zaremba, Maria Banach, Andrzej Pierściński

Disturbances in Carbohydrate Metabolism in Mice after Intraperitoneal Injection of Wheat Germ Lectin (WGA)

Summary

Lectin extracted from *Triticum vulgare* (wheat germ agglutinin – WGA) was injected intraperitoneally to mice in a single dose of 30 mg per kg of body weight. The glucose content in the blood and the content of liver and muscle glycogen were determined 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120 and 144 hrs after the WGA injection.

It can be concluded that administration of lectin leads to a serious disturbances in sugar metabolism in the organism since it results in a significant drop in blood glucose and liver as well as muscle glycogen contents within 12 hrs of injection. A lability in glucose and glycogen contents was observed in all the experimental groups the proof of which were minimum and maximum of concentrations occurring in the investigated tissues.