
МИКРОБИОЛОГИЯ И ИММУНОЛОГИЯ

РОЛЬ ОКСИДА АЗОТА, ПРОДУЦИРУЕМОГО ЛАКТОБАЦИЛЛАМИ, В РАССЛАБЛЕНИИ ГЛАДКОЙ МУСКУЛАТУРЫ КИШЕЧНИКА

Д.Р.Яруллина, Р.О.Михеева*, Г.И.Сабируллина*,
П.В.Зеленихин, О.Н.Ильинская, Г.Ф.Ситдикова*

*Кафедра микробиологии (зав. — проф. О.Н.Ильинская), *кафедра физиологии человека и животных (зав. — проф. Г.Ф.Ситдикова) ФГАОУ ВПО Казанского (Приволжского) федерального университета, Казань, РФ*

Показано, что аппликация NO-продуцирующих лактобацилл на сегмент тощей кишки крысы приводила к расслаблению мускулатуры, которое усиливалось при активации микробного синтеза оксида азота субстратом NO-синтазы L-аргинином. Аналогичное изменение сократительной активности кишечника наблюдалось в ответ на экзогенный NO, образуемый нитропруссидом натрия. Полученные результаты свидетельствуют об участии NO, синтезируемого пробиотическими лактобациллами, в регуляции моторной функции кишечника.

Ключевые слова: *Lactobacillus plantarum*, оксид азота, спонтанная сократительная активность, гладкая мускулатура, тощая кишка крысы

NO выполняет ряд важных физиологических функций в пищеварительной системе: поддерживает сосудистый тонус, участвует в иммунных реакциях и в передаче нервных импульсов, а также обеспечивает моторную функцию ЖКТ, вызывая расслабление гладкой мускулатуры кишечника. Данный эффект NO реализуется посредством цГМФ-зависимых или цГМФ-независимых механизмов непосредственно в гладкомышечных клетках или путем ингибирования высвобождения возбуждающих нейромедиаторов, таких как ацетилхолин или вещество P [13]. Источником NO в пищеварительном тракте наряду с NO-синтазами (NOS) организма является кишечная микрофлора, которая продуцирует NO в ходе нитрат- и нитритредукции, а также, снижая pH, создает условия для химического образования NO из нитритов в кислой среде [11,12,14]. NO бактериального происхождения, легко диффундируя через мембраны, может проникать в ткани и проявлять в них свою функциональную активность. Так, синтезируемый бактериями *Bacillus subtilis* в кишечнике *Caenorhabditis elegans* NO регулирует экспрессию генов в клет-

ках червя и оказывает тем самым влияние на продолжительность его жизни и устойчивость к стрессам [6]. Однако в целом значение микробного NO в пищеварительном тракте остается не оцененным.

Лактобациллы входят в состав нормальной микрофлоры кишечника человека, в связи с чем широко используются в современных пробиотиках и пищевых кисломолочных продуктах [5]. У некоторых видов лактобацилл (*Lactobacillus plantarum*, *L. fermentum*, *L. farciminis*) обнаружена способность образовывать NO [4,7,8,15], что, вероятно, отчасти обуславливает положительное действие пробиотиков на организм [7,11,15].

Цель данной работы — определить влияние бактерий *Lactobacillus plantarum* 8P-A3 на сократительную активность кишечника крысы, рассматривая роль NO симбиотических кишечных микроорганизмов в моторной функции ЖКТ и обосновывая дополнительные эффекты пробиотиков на основе NO-продуцирующих лактобацилл.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование выполнено в соответствии с международными требованиями по работе с животными,

утвержденными локальным этическим комитетом. Измерение спонтанной сократительной активности (ССА) проводили на препаратах тощей кишки (ТК) крысы на установке "Biorac Systems Inc." [1]. Животное анестезировали 5% изофлураном ("Abbott Laboratories"), вырезали сегмент ТК длиной 8 мм, который подвешивали вертикально в ванночке объемом 20 мл. Нижний конец жестко фиксировали к блоку, верхний конец соединяли с тензометрическим датчиком (TSD125C, "Biorac Systems Inc."). Препарат омывали раствором Кребса: 121.0 мМ NaCl, 5.9 мМ KCl, 2.5 мМ CaCl₂, 1.2 мМ MgCl₂, 25.0 мМ NaHCO₃, 1.2 мМ NaH₂PO₄, 8.0 мМ C₆H₁₂O₆, pH 7.2-7.4 при 37°C и аэрации смесью 95% O₂ и 5% CO₂. После подвешивания препарат выдерживали в течение 60-90 мин до получения стабильных растяжений. Препараты, которые не развивали стабильных спонтанных сократительных ответов, исключали из исследования. Каждая серия экспериментов выполнена на 2-4 полосках 6 животных.

В качестве эффекторов ССА кишечника в работе использовали субстрат NO-синтазы L-аргинин (100, 1000 мкМ), блокатор NO-синтазы L-NAME (200 мкМ), донор NO нитропруссид натрия (НН, 10-1000 мкМ) ("Sigma-Aldrich") и суспензию бактерий *L. plantarum* 8P-A3 ("Лактобактерин сухой", ФГУП "Пермское НПО "Биомед" [4]) (10⁷-10⁸ клеток/мл), которые вносили в объеме 200 мкл в ванночку с сегментом ТК в указанных конечных концентрациях. Для приготовления суспензии клеток *L. plantarum* 8P-A3 бактерии выращивали микроаэрофильно на среде MRS в течение 24 ч и трижды отмывали от среды центрифугированием в изотоническом растворе NaCl. Жизнеспособность бактерий регистрировали с помощью окрашивания йодидом пропидия (2.5 мкг/мл, "Sigma-Aldrich") и последующей проточной цитофлюориметрии на "BD FACSCanto II". Биосинтез бактериями NO определяли с помощью окрашивания сульфатом 1,2-диаминоантрахинона (DAA, 50 мкг/мл, "Molecular Probes", 30 мин инкубации при 37°C) с последующей микроскопией отмытых от красителя бактерий под флюоресцентным микроскопом "Leica" DM 6000B [3]. Концентрацию NO в растворах НН рассчитывали по калибровочной прямой, построенной с использованием свежеприготовленных растворов NaNO₂ ("Sigma-Aldrich") в концентрациях 0-100 мкМ. Нитриты, продукты окисления NO в аэробных условиях, определяли спектрофотометрически ($\lambda=540$ нм) при помощи реактива Грисса ("Sigma-Aldrich").

ССА регистрировали при помощи усилителя "DA100C", последующий анализ силы сокращения препарата (в граммах) проводили в программе

"AcqKnowledge 4.1". Для оценки достоверности различий использовали *t* критерий Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Мы оценивали влияние пробиотических лактобацилл *L. plantarum* 8P-A3 на ССА кишечника крысы. Данные микроорганизмы образуют NO, о чем свидетельствуют результаты окрашивания флюоресцентным индикатором оксида азота DAA (рисунок, а). Несмотря на высокую проницаемость клеточных мембран для NO, флюоресценция присутствовала исключительно в бактериях, что указывает на бактериальное происхождение NO.

Инкубация ТК в суспензии лактобацилл приводила к снижению ССА гладкомышечной мускулатуры, причем релаксация нарастала при увеличении количества микроорганизмов (рисунок, б). Так, добавление суспензии лактобацилл плотностью 10⁷ клеток/мл приводило к уменьшению амплитуды сокращений сегмента кишечника на 6.6% относительно исходных значений, а увеличение концентрации клеток на порядок вызывало еще более выраженное снижение амплитуды на 13.4% ($n=6$, $p<0.05$).

При аппликации суспензии лактобацилл, содержащей субстрат NOS L-аргинин (100 мкМ), амплитуда сокращений снизилась на 23.1% ($n=6$, $p<0.05$; рисунок, в, г, д). Поскольку ранее мы показали, что аргинин активирует синтез NO у *L. plantarum* 8P-A3 [3], релаксацию препарата мы связываем с возросшим уровнем NO. Амплитуда сокращений в данном варианте снижалась достоверно больше, чем при воздействии только L-аргинином (рисунок, д), следовательно, обнаруженное расслабление мускулатуры не связано с индукцией L-аргинином активности собственных NOS кишечника.

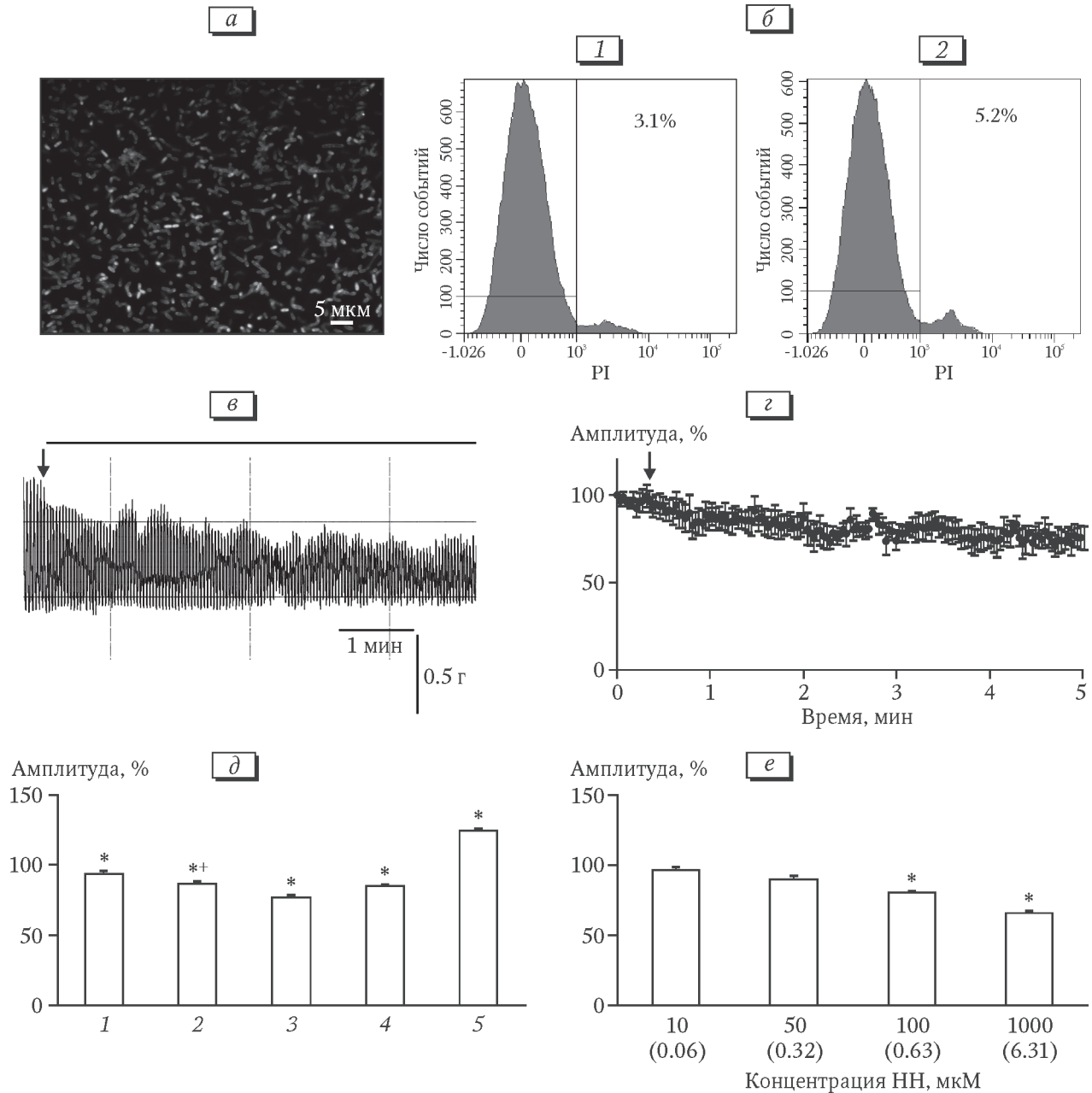
Расслабляющее действие лактобацилл на ТК крысы совпадает с эффектом НН. В ответ на аппликацию НН сила спонтанных сокращений кишечника снижалась пропорционально концентрациям NO, выделяющимся из НН (рисунок, е). При добавлении в экспериментальную систему 100 мкМ НН уровень NO в ней составлял 0.63 мкМ, и регистрировалось снижение амплитуды сокращений на 19.4% по сравнению с состоянием до воздействия НН ($n=6$, $p<0.05$), что соизмеримо с эффектом суспензии лактобацилл в условиях активации синтеза NO L-аргинином (снижение амплитуды на 23.1%; рисунок, д).

Микромолярные концентрации NO, как правило, токсичны для бактерий [2], однако с помощью флюоресцентного окрашивания йодидом пропидия мы показали, что количество живых

клеток составляет более 95% как в популяции лактобацилл с базовым уровнем синтеза NO, так и у бактерий с индуцированным L-аргинином увеличенным синтезом NO (рисунок, б). Следовательно-

но, образуемый NO не оказывает на лактобациллы токсическое действие.

Таким образом, экспериментально обнаруженный NO в клетках лактобацилл оказывает на



Влияние NO-продуцирующих бактерий *Lactobacillus plantarum* 8P-A3 на ССА ТК крысы.

а – выявление NO в бактериях *L. plantarum* 8P-A3 с помощью DAA и флуоресцентной микроскопии. *б* – жизнеспособность клеток *L. plantarum* 8P-A3. Бактерии ресуспензировали в изотоническом растворе NaCl без (1) и в присутствии 100 мкМ L-аргинина (2). *в* – механограмма. *г* – динамика силы сокращения сегмента ТК крысы при аппликации суспензии *L. plantarum* 8P-A3 плотностью 10^8 клеток/мл, содержащей 100 мкМ L-аргинина (стрелка). За 100% принята исходная сила сокращений препарата. *д* – влияние *L. plantarum* 8P-A3, L-аргинина и L-NAME на ССА ТК крысы. 1 – *L. plantarum* 8P-A3, 10^7 /мл, 2 – *L. plantarum* 8P-A3, 10^8 /мл, 3 – *L. plantarum* 8P-A3, 10^8 /мл+L-аргинин, 100 мкМ, 4 – L-аргинин, 100 мкМ, 5 – L-NAME, 200 мкМ. *е* – влияние НН на ССА ТК крысы. В скобках – концентрации NO (мкМ), выделяющиеся из НН.

$p < 0.05$ по сравнению *с показателем до воздействия (100%), +с *L. plantarum* 8P-A3, 10^8 /мл+L-аргинин, 100 мкМ.

сегмент кишечника крысы расслабляющее действие, аналогичное НН и усиливающееся при добавлении субстрата NOS L-аргинина, что позволяет рассматривать бактерии *L. plantarum* 8P-A3 в качестве экзогенного донора NO в кишечнике.

В ЖКТ присутствуют эндогенные системы синтеза NO, вызывающего расслабление гладкой мускулатуры: нейрональные (nNOS) и эндотелиальные (eNOS) NOS [13]. О функциональной активности NO, синтезируемого собственными NOS препарата, можно судить по увеличению амплитуды сокращения кишечника при добавлении ингибитора NOS L-NAME (200 мкМ) и расслаблению гладкомышечных клеток при аппликации L-аргинина (100 мкМ) (рисунок, д). Регистрируемое под действием лактобацилл снижение ССА гладкой мускулатуры может быть обусловлено индукцией бактериями iNOS, как это показано в культуре альвеолярных макрофагов свиньи [9]. Однако для индукции iNOS требуется несколько часов [10], тогда как изменение мышечного тонуса в ответ на аппликацию бактерий наблюдали в течение 3-5 мин. Вероятно, регистрируемое нами увеличение количества NO в кишечнике под действием лактобацилл не связано с активацией бактериями iNOS, а обусловлено микробным синтезом NO.

Повышение концентрации NO в кишечнике вследствие индукции iNOS лактобациллами традиционно рассматривают как фактор пробиотической активности бактерий, стимулирующий иммунную функцию пищеварительного тракта [7,11,15]. Результаты нашей работы подтверждают положительное действие на организм NO, образующегося благодаря кишечной микрофлоре, однако мы впервые рассматриваем пробиотические бактерии как экзогенный источник NO, оказывающего расслабляющее действие на гладкую мускулатуру кишечника.

Работа выполнена в рамках Программы повышения конкурентоспособности Казанского (Приволжского) федерального университета при поддержке РФФИ (гранты № 12-04-01226а, № 14-04-31661 мол_а).

ЛИТЕРАТУРА

1. Шафигуллин М.У., Зефирова Р.А., Сабируллина Г.И. и др. // Бюл. экспер. биол. 2014. Т. 157, № 3 С. 275-279.
2. Яруллина Д.Р., Вакатова Л.В., Криворучко А.В. и др. // Микробиология. 2013. Т. 82, № 4. С. 417-421.
3. Яруллина Д.Р., Ильинская О.Н. // Микробиология. 2007. Т. 76, № 4. С. 570-572.
4. Яруллина Д.Р., Ильинская О.Н., Аганов А.В. и др. // Микробиология. 2006. Т. 75, № 6. С. 731-736.
5. Giraffa G., Chanishvili N., Widyastuti Y. // Res. Microbiol. 2010. Vol. 161, N 6. P. 480-487.
6. Gusarov I., Gautier L., Smolentseva O. et al. // Cell. 2013. Vol. 152, N 4. P. 818-830.
7. Lamine F., Fioramonti J., Bueno L. et al. // Scand. J. Gastroenterol. 2004. Vol. 39, N 1. P. 37-45.
8. Morita H., Yoshikawa H., Sakata R. et al. // J. Bacteriol. 1997. Vol. 179, N 24. P. 7812-7815.
9. Pipenbaker N., Moeller P.L., Dolinsek J. et al. // Int. Dairy J. 2009. Vol. 19, N 3. P. 166-171.
10. Sade K., Schwartz D., Wolman Y. et al. // J. Lab. Clin. Med. 1999. Vol. 134, N 5. P. 471-477.
11. Sobko T., Huang L., Midtvedt T. et al. // Free Radic. Biol. Med. 2006. Vol. 41, N 6. P. 985-991.
12. Sobko T., Reinders C.I., Jansson E. et al. // Nitric Oxide. 2005. Vol. 13, N 4. P. 272-278.
13. Toda N., Herman A.G. // Pharmacol. Rev. 2005. Vol. 57, N 3. P. 315-338.
14. Vermeiren J., Van de Wiele T., Verstraete W. et al. // J. Biomed. Biotechnol. 2009. doi:10.1155/2009/284718.
15. Xu J., Verstraete W. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2001. Vol. 56, N 3-4. P. 504-507.

Получено 31.07.14