УДК 579.22

МОДУЛЯЦИЯ БИОСИНТЕЗА ОКСИДА АЗОТА (NO) У ЛАКТОБАЦИЛЛ

Д.Р. Яруллина, О.А. Смоленцева, О.Н. Ильинская

(Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань; e-mail: yadinka@mail.ru)

В работе охарактеризованы эффекты субстрата NO-синтазы (NOS) L-аргинина и классических ингибиторов NOS млекопитающих на биосинтез оксида азота (NO) у пробиотических бактерий *Lactobacillus plantarum* 8P-A3. С помощью флуоресцентного индикатора NO 1,2-диаминоантрахинона (DAA) показана индукция образования оксида азота экзогенным L-аргинином, что традиционно подтверждает NO-синтазное происхождение этого агента. Ни один из использованных ингибиторов трех различных изоформ NOS млекопитающих (L-NAME, L-NIL, nNOS ингибитор I) не оказывал существенного ингибирующего действия на NO-синтазную активность лактобацилл.

Ключевые слова: *лактобациллы, NO-синтаза, L-аргинин, ингибиторы, жизнеспособность.*

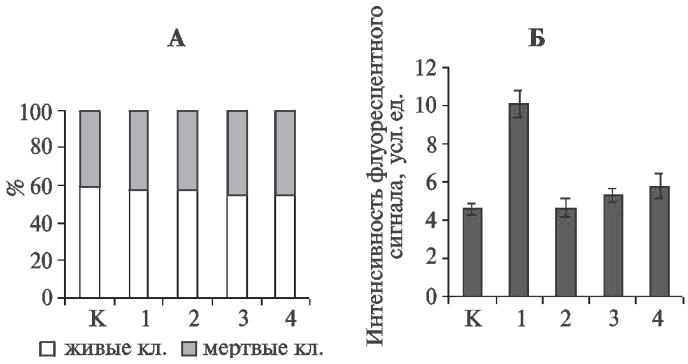
Оксид азота (NO) представляет собой универсальный посредник в регуляции клеточных функций и межклеточных коммуникаций. NO играет важную роль в реализации таких функций, как нейротрансмиссия, вазодилатация, регуляция тонуса гладких мышц, снижение агрегации тромбоцитов, реакции иммунной системы, состояние памяти, процесс обучения и др., а также в некоторых патологических процессах. Функциональная активность NO в клетках млекопитающих обеспечивается его генерацией из L-аргинина, катализируемой семейством изоферментов NO-синтаз (NOS) [1]. В отличие от эукариот синтез и функции этой молекулы у бактерий изучены слабо.

У *Lactobacillus plantarum* предполагается наличие NO-синтазы [2]. Ранее нами методом ЭПР впервые была установлена способность *L. plantarum* 8P-A3 синтезировать оксид азота. Было показано, что данный штамм не образует NO в процессе денитрификации, однако обладает, подобно клеткам млекопитающих, NO-синтазной активностью [3]. В настоящей работе флуоресцентным методом исследовано влияние субстрата и ингибиторов NOS на NO-синтазную активность *L. plantarum*.

Бактерии *L. plantarum* 8P-A3, выделенные нами [3] из препарата "Лактобактерин сухой" (ФГУП Пермское НПО "Биомед"), выращивали в 30 мл питательной среды MRS (Sigma), содержащей L-аргинин, L-NAME, L-NIL, nNOS ингибитор I или без добавок (контроль), в течение 48 ч до стационарной фазы роста, отмывали от среды Hanks' буфером (PAA Laboratories GmbH, Австрия) и концентрировали центрифугированием. NO определяли с помощью флуоресцентного красителя 1,2-диаминоантрахинона, 50 мкг/мл (DAA) (Molecular Probes, Invitrogen). Жизнеспособность лактобацилл определяли с помощью реактива LIVE/DEAD *Bac*Light Bacterial Viability Kit (LIVE/DEAD) (Molecular Probes, Invitrogen). Пробы микроскопировали под флуоресцентным микроскопом Leica DM 6000B (Германия); для анализа изображений использовали компьютерную программу Leica FW4000. Статистическую обработку результатов проводили в программе Microsoft Excel.

В работе показана индукция NO-синтазной активности *L. plantarum* 8P-A3 L-аргинином. В соответствии с явлением, известным как "парадокс L-аргинина" (экзогенный L-аргинин, независимо от его концентрации внутри клетки, стимулирует синтез NO [4]), можно ожидать, что добавление в среду культивирования *L. plantarum* L-аргинина будет способствовать увеличению уровня NO. Действительно, с помощью DAA было зафиксировано, что внесение в среду роста аргинина существенно активировало синтез NO исследуемыми микроорганизмами по сравнению с клетками, инкубируемыми без аргинина. Отмечено также фоновое образование NO из эндогенного аргинина (рисунок, *Б*). При этом показано, что 100 мкМ аргинин не оказывает влияния на жизнеспособность бактерий (рисунок, *Б*). Следовательно, изменение интенсивности флуоресцентного сигнала не связано с воздействием данной аминокислоты на рост культуры, а происходит в клетках *L. plantarum* 8P-A3, как и в клетках млекопитающих, благодаря увеличению продукции оксида азота NO-синтазой под воздействием экзогенного L-аргинина ("парадокс L-аргинина").

В исследовании влияния классических ингибиторов NOS млекопитающих на NO-синтазную активность лактобацилл использовали ингибиторы трех различных изоформ NOS млекопитающих: конкурентный ингибитор eNOS L-NAME, iNOS-L-NIL



Влияние L-аргинина и ингибиторов NOS на жизнеспособность бактерий *Lactobacillus plantarum* 8P-A3 (**А**) и биосинтез NO, измеренный флуоресцентным окрашиванием 1,2-диаминоантрахиноном (DAA) (**Б**). Жизнеспособность бактерий определяли с помощью флуоресцентного окрашивания LIVE/DEAD *Bac*Light Bacterial Viability Kit. К — контроль, 1 — 100 мкМ L-аргинин, 2 — 100 мкМ L-NAME, 3 — 100 мкМ L-NIL, 4 — 10 мкМ nNOS ингибитор I

и nNOS — nNOS ингибитор I. Ни один из них не оказывал существенного ингибирующего действия на NO-синтазную активность *L. plantarum* 8P-A3 (рисунок, *Б*). Влияния ингибиторов на рост и жизнеспособность клеток также не обнаружено (рисунок, *А*). Неэффективность ингибиторов NOS млекопитающих в отношении NO-синтазной активности бактерий может быть связана с деградацией ингибиторов ферментами микроорганизмов [5], а также невысокой проницаемостью бактериальных мембран для ингибиторов NOS млекопитающих [6]. Указанный эффект может объясняться также структурными и функциональными различиями между NOS млекопитающих и лактобацилл.

Полученные результаты, с одной стороны, служат доказательством NO-синтазного образования оксида азота у *L. plantarum*, а с другой — свидетельствуют о специфичности NO-синтазного пути образования оксида азота у лактобацилл. В целом они обосновывают важность дальнейших исследований NO-синтазной активности у лактобацилл, особенно в связи с их высокой практической значимостью как пробиотиков.

Авторы выражают благодарность К. Бойерляйну (Институт фармакологии им. Рудольфа Буххайма, г. Гиссен, Германия) за помощь в проведении флуоресцентной микроскопии.

* * *

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 09-04-97032), ФЦП “Научные и научно-педагогические кадры инновационной России”, программы РНП 2.1.1/920, ГК 02.740.11.0391.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Alderton W.K., Cooper C.E., Knowles R.G.* Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition // Biochem. J. 2001. Vol. 357. P. 593—615.

2. *Adawi D., Kasravi F.B., Molin G., Jeppsson B.* Effect of *Lactobacillus* supplementation with and without arginine on liver damage, bacterial translocation in an acute liver injury model in the rat // Hepatology. 1997. Vol. 25. N 3. P. 642—647.

3. *Яруллина Д.Р., Ильинская О.Н., Аганов А.В., Силкин Н.И., Зверев Д.Г.* Альтернативные пути образования оксида азота у лактобацилл: обнаружение возможной NO-синтазной активности методом ЭПР // Микробиология. 2006. Т. 75. № 6. С. 731—736.

4. *Tsikas D., Boger R.H., Sandmann J., Bode-Boger S.M., Frolich J.C.* Endogenous nitric oxide synthase inhibitors are responsible for the L-arginine paradox // FEBS Letters. 2000. Vol. 478. P. 1—3.

5. *Choi W.S., Seo D.W., Chang M.S., Han J.W., Hong S.Y., Paik W.K., Lee H.W.* Methylesters of L-arginine and N-nitro-L-arginine induced nitric oxide synthase in *Staphylococcus aureus* // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1998. Vol. 246. P. 431—435.

6. *Wach M.J., Kers J.A., Krasnoff S.B., Loria R., Gibson D.M.* Nitric oxide synthase inhibitors and nitric oxide donors modulate the biosynthesis of thaxtomin A, a nitrated phytotoxin produced by *Streptomyces* spp. // Nitric Oxide. 2005. Vol. 12. P. 46—53.

Поступила в редакцию
27.05.10

MODULATION OF NITRIC OXIDE (NO) BIOSYNTHESIS IN LACTOBACILLI

D.R. Yarullina, O.A. Smolentseva, O.N. Ilinskaya

We characterized effects of nitric oxide synthase (NOS) substrate and inhibitors on NO biosynthesis in probiotic bacteria *Lactobacillus plantarum* 8P-A3. NO-synthase derived origin of detected nitric oxide was confirmed by induction of NO production by exogenous L-arginine. None of used inhibitors of three isoforms of mammalian NOSs (L-NAME, L-NIL, nNOS inhibitor I) showed significant inhibitory effect on lactobacillar NO-synthase activity.

Key words: *lactobacilli, NO-synthase, L-arginine, inhibitors, viability.*

Сведения об авторах

Яруллина Дина Рашидовна — канд. биол. наук, ассистент Казанского (Приволжского) федерального университета (К(П)ФУ), г. Казань. Тел.: 89270-300-950; e-mail: yadinka@mail.ru, kasfes@gmail.com

Смоленцева Ольга Александровна — аспирантка К(П)ФУ, г. Казань. E-mail: olgasmolentseva@mail.ru

Ильинская Ольга Николаевна — докт. биол. наук, проф., зав. кафедрой микробиологии К(П)ФУ, г. Казань. Тел.: (843) 231-52-55; e-mail: Olga.Ilinskaya@ksu.ru