

LAKTOBACILŲ METABOLIZMO PRODUKTŲ ĮTAKA REAKTYVIŲ DEGUONIES FORMŲ GAMYBAI *IN VITRO*

Rimantas Stakauskas¹, Juozas Pieškus²

¹Lietuvos veterinarijos akademija, Imunologijos laboratorija, Tilžės 18, LT-3022, Kaunas. Tel.: 362844

²Imunologijos institutas, Molėtų pl. 29, Lt-2021 Vilnius. Tel.: 22 469249

Santrauka. Reaktyvios deguonies formos (ROS) yra toksiškos imuninės sistemos molekulės, kurios dalyvauja sunaikinant patogeninius mikroorganizmus ir navikus. Nustatyta, kad šių molekulių gamybai įtakos turi virškinimo mikroflorą sudarančios bakterijos ir jų metabolizmo produktai. Buvo tirta probiotinių bakterijų *Lactobacillus plantarum* ir *Lactobacillus fermentum* metabolizmo produktų įtaka ROS gamybai galvijų periferinio kraujo polimorfonuklearinėse ląstelėse (PMNC) *in vitro*. ROS produkcija nustatyta su dihidrorodaminu 123 (DHR 123). Jis oksiduojamas pagamintų ROS iki žaliai fluorescuojančio rodamino. Fluorescencijos intensyvumas būna proporcingas ROS kiekiui. Nustatyta, kad *Lactobacillus plantarum* ir *Lactobacillus fermentum* metabolizmo produktai *in vitro* stimuliuoja galvijų periferinio kraujo PMN ląsteles gaminti reaktyvias deguonies formas (ROS). Stimuliacijos efektyvumas tiesiogiai priklauso nuo laktobacilų metabolizmo produktų koncentracijos.

Raktažodžiai: laktobacilos, polimorfonuklearinės ląstelės (PMNC), reaktyvios deguonies formos (ROS).

THE INFLUENCE OF LACTOBACILLI METABOLIC PRODUCTS ON THE PRODUCTION OF REACTIVE OXYGEN SPECIES *IN VITRO*

Summary. Reactive oxygen species (ROS) are toxic molecules of the immune system, which play important role in controlling bacterial pathogens and tumors. Bacteria of digestive microflora and their metabolic products influence ROS production. The effect of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus fermentum* metabolic products on ROS production in bovine polymorphonuclear cells *in vitro* was investigated. Dihydrochlorodamin 123 was used for the detection of ROS. It is oxidized by ROS into rhodamin, which has green fluorescence. The ROS production was evaluated by the intensity of green fluorescence. Metabolic products of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus fermentum* stimulated ROS production in bovine polymorphonuclear cells *in vitro*. The effect of stimulation depends on the concentration of metabolic products.

Keywords: lactobacilli, polymorphonuclear cells (PMNC), reactive oxygen species (ROS)

Įvadas. Reaktyvios deguonies formos (ROS) yra toksiškos imuninės sistemos molekulės, kurios dalyvauja sunaikinant patogeninius mikroorganizmus ir navikus. Jos taip pat moduliuoja citokinų produkciją ir reguliuoja imuninę ląstelių apoptozę [2,3,7,8]. Svarbiausias vaidmuo ROS gamyboje tenka fermentui mieloperoksidazei, nuo kurio aktyvumo priklauso pagamintų ROS kiekis, taigi ir fagocituotų mikroorganizmų sunaikinimo efektyvumas [17].

Nustatyta, kad imunokompetentinių ląstelių funkcijos, taip pat ir ROS gamyba, yra įtakojamos žarnyno mikroflorą sudarančių mikroorganizmų ir jų metabolizmo produktų. Svarbų vaidmenį normalios žarnyno mikrofloros susidaryme ir palaikyme vaidina pienarūgštės bakterijos: laktobacilos, bifidobakterijos ir streptokokai. Iš laktobacilų fermentacijos produktų buvo išskirti mažos molekulinės masės peptidai, pasižymintys imunostimuliacinėmis savybėmis [11]. Atlikus šių peptidų biocheminę analizę – chromatografiją, nustatyta, kad skirtingos frakcijos stimuliuoja atskiras imunines funkcijas [12].

Tiriant pienarūgščių bakterijų ir jų fermentacijos produktų įtaką ROS produkcijai, nustatyta, kad fermentuoti produktai, neturintys gyvų bakterijų, šiek tiek padidino ROS produkciją. Produktai, kurių sudėtyje buvo didelė koncentracija gyvų *L. johnsonii* bakterijų, ženkliai padidino ROS produkciją ir fagocitinį aktyvumą, tuo tarpu 4 savaites išlaikyti produktai, kurių sudėtyje buvo

10 kartų mažesnė koncentracija gyvų *L. johnsonii*, praktiškai neturėjo stimuliuojančio poveikio [4].

Laktobacilų stimuliacinis poveikis ROS produkcijai sustiprinamas mitogenu forbol 12-myristat 13-acetatu (PMA) ir šis veikimas yra sinergistinis, o ne pridėtinis [5]. Šešias savaites vartojant laktobacilas, reaktyvių deguonies formų produkcija ženkliai padidėjo inkubuojant neutrofilus su PMA arba zymosanu [10]. Laktobacilos stimuliuoja ir kitą sistemą, dalyvaujančią fagocituotų patogenų sunaikinime – lizocimą, nors ROS gamyba skatinama labiau [5].

Dauguma darbų apie laktobacilų metabolitų poveikį imunokompetentinių ląstelių funkcijoms atliekama *in vivo*. Natūralių sąlygų išlaikymas tyrimų metu yra labai svarbus, tačiau kita vertus, *in vivo* neįmanoma išvengti papildomų veiksnių, tokių kaip tarpląsteliniai signalai per citokinus. Jie gali lemti galutinius rezultatus, todėl lieka neaiškus nei veikimo mechanizmas, nei kokią įtaką turėjo laktobacilos ar jų metabolitai. Todėl *in vitro* tyrimai leidžia išvengti daugelio papildomų veiksnių ir išanalizuoti tiesioginį probiotinių bakterijų metabolitų poveikį PMNC funkcijoms.

Darbo tikslas – nustatyti *Lactobacillus plantarum* ir *Lactobacillus fermentum* metabolizmo produktų įtaką ROS gamybai galvijų periferinio kraujo polimorfonuklearinėse ląstelėse (PMNC) *in vitro*.

Medžiagos ir metodai. Laktobacilų metabolizmo produktų paruošimas.

Tyrimui naudotos *Lactobacillus plantarum* U-14 ir *Lactobacillus fermentum* U-5 padermės, kurios išskirtos ir pasportizuotos LVA Virškinimo fiziologijos ir patologijos moksliniame centre [15,16]. Laktobacilos buvo kultivuojamos MRS terpėje 7 paras, esant +37°C ir 5% CO₂. Pagamintos rūgštys neutralizuotos su Hepes ("Biochrom", Vokietija) iki pH 6,5. Kultūros iškoštos pro bakterinius filtrus, kurių porų diametras 0,22µm ("Schleicher & Schuell", Vokietija). Paruošti filtratai buvo skiedžiami su RPMI 1640 bazine terpe ("PAN", Vokietija), turinčia 18mM Na₂CO₃ ("Sigma"), 4mM L-gliutamino ("PAN", Vokietija), 15mM Hepes ("Biochrom", Vokietija), ir 100VV/ml penicilino bei 100µg/ml streptomicino ("PAN", Vokietija) (sutrumpinimas – R0⁺). Tyrimuose naudotų laktobacilų produktų ir kontrolinės MRS terpės galutinės koncentracijos buvo 1:10, 1:20, 1:40 ir 1:80.

Veninis kraujas tyrimams buvo steriliai imtas iš šešių (n=6) kliniškai sveikų karvių į vakuuminius mėgintuvėlius su antikoagulantu natrio etilendiamino tetraacetatu (NaEDTA) ("Becton Dickinson", Prancūzija). Polimorfonuklearinės ląstelės (PMNC) išskirtos tankio gradientu Ficoll-Isopaque ir atlikus hipotoninę eritrocitų lizę [9]. Ląstelių gyvybingumas nustatytas 0,1% tripano mėliu ("EGA-Chemie", Vokietija) ir buvo >95%.

ROS nustatymo esmė su dihidrorodaminu 123 (DHR 123) yra ta, kad suspensijoje esantis DHR 123 pasyviai difunduoja į ląstelę, kur yra oksiduojamas vienos iš reaktyvių deguonies formų - H₂O₂ į žaliai fluorescuojantį rodaminą. Susidariusio rodaminio kiekis, arba fluorescencijos intensyvumas, yra ekvivalentiškas ląstelėje pagaminto H₂O₂ kiekiui [6,13,14].

Paruošiama 4x10⁶/ml PMNC suspensija R0⁺ terpėje. Į U-formos, 96 duobučių plokštelę ("Corning Costar", JAV) išpilstoma po 100µl skirtingų praskiedimų laktobacilų metabolizmo produktų ir MRS terpės. Išpilstoma po 100µl PMNC suspensijos. Plokštelė 10 min. inkubuojama drėgnoje aplinkoje esant +37°C ir 5% CO₂. Po to išpilstoma po 20µl skirtingų koncentracijų PMA ("Sigma"), kad galutinė koncentracija būtų 150nM, 300nM ir 600nM. Plokštelė vėl inkubuojama 10 min. Paruošiama DHR 123 ("Molecular Probes", JAV) koncentracija 15µg/ml fosfatiniame buferyje. Išpilstoma po 20µl į kiekvieną duobutę ir vėl inkubuojama 10 min.

Po inkubacijos plokštelė dedama ant ledo 30 min., kad atšoktų ląstelės, nes veikiant PMA, jos prilimpa prie duobutės sienelių.

Tiriama tėkmės citometru FACScan ("Becton Dickinson", Vokietija). Gauti duomenys analizuojami ir vertinami WinMDI 2.8 programa [18].

Statistinė duomenų analizė atlikta pagal Altman D.G. (1999) su Microsoft Excel 7.0 programa. Apskaičiuoti aritmetiniai vidurkiai, jų vidutinės paklaidos, standartiniai nukrypimai ir Student'o patikimumo koeficientai. Duomenys laikomi patikimais, kai p < 0,05.

Tyrimų rezultatai. ROS produkcijos įvertinimui ir rezultatų palyginimui naudotas vidutinis fluorescencinis intensyvumas.

Tyrimų rezultatai parodė, kad nepriklausomai nuo PMA koncentracijos, tiek *L.p.*, tiek ir *L.f.* produktai aktyviausiai skatino ROS gamybą praskiedime 1:20 – iki 84 – 87% (p<0.05) (1 lentelė). *L.p.* ir *L.f.* produktų veikimas nežymiai skyrėsi tik esant praskiedimui 1:20. Esant didesniems praskiedimams, abiejų padermių laktobacilų produktai ROS gamybą stimuliavo panašiai. Tik esant PMA koncentracijai 600 nM, ir mažesnės laktobacilų produktų koncentracijos pasižymėjo stipresniu stimuliaciniu poveikiu - iki 43% *L.p.* ir iki 32% *L.f.* produktai. Esant praskiedimui 1:80, *L.p.* produktų stimuliacinis poveikis buvo 11% (p<0.05) stipresnis už *L.f.* produktų poveikį.

Aptarimas ir išvados. Reaktyvios deguonies formos yra toksiški imuninės sistemos junginiai, kurie dalyvauja sunaikinant patogeninius mikroorganizmus ir navikus, moduluojant citokinų produkciją ir reguliuojant imuninę ląstelių apoptozę. Literatūroje pateikiami duomenys akcentuoja, kad tik gyvos laktobacilos pasižymi ROS produkcijos stimuliacija *in vivo* [4]. Vienas iš tokios stimuliacijos mechanizmų galėtų būti susijęs su laktobacilų sugebėjimu prisitvirtinti prie žarnų gleivinės ir betarpiškai sąveikauti su žarnyno imunokompetentinėmis ląstelėmis. Po tokio kontakto ląstelės gali sekretuoti atitinkamus citokinus, stimuliuojančius ROS gamybą. Tačiau kaip rodo gauti rezultatai, laktobacilų metabolizmo produktai pasižymi ir tiesioginiu ROS gamybą skatinančiu poveikiu.

Reaktyvių deguonies formų produkcija buvo stimuliuojama priklausomai nuo laktobacilų metabolizmo produktų praskiedimo. Didžiausias efektas gautas esant praskiedimui 1:20. *L.p.* produktai iki 10% aktyviau skatino ROS produkciją negu *L.f.* produktai. Stimuliacinis laktobacilų produktų efektas esant praskiedimui 1:20 praktiškai nepriklausė nuo PMA koncentracijos ir tiek esant 150µM, tiek 600µM koncentracijai, buvo 84 – 87% . Tik esant dideliems laktobacilų produktų praskiedimams, ROS gamyba tiesiogiai priklausė nuo PMA koncentracijos ir didėjo nuo 11 iki 42%.

Toks tiesioginis laktobacilų metabolizmo produktų stimuliacinis poveikis ROS gamybai papildo imunomoduliacinių mechanizmų sąrašą, kurių dėka laktobacilos pagreitina patogeninių mikroorganizmų sunaikinimą ir taip sumažina mirtingumą bei pagreitina sveikimą sergant infekcinėmis ligomis.

Tėkmės citometro histogramos stimuliuojant PMN ląsteles skirtingų koncentracijų laktobacilų metabolizmo produktais ir esant skirtingoms PMA koncentracijoms pateikiamos 1 pav.

Išvados: *Lactobacillus plantarum* ir *Lactobacillus fermentum* metabolizmo produktai *in vitro* skatina galvijų periferinio kraujo PMN ląsteles gaminti reaktyvias deguonies formas (ROS). Stimuliacijos efektyvumas yra tiesiogiai priklausomas nuo laktobacilų produktų koncentracijos.

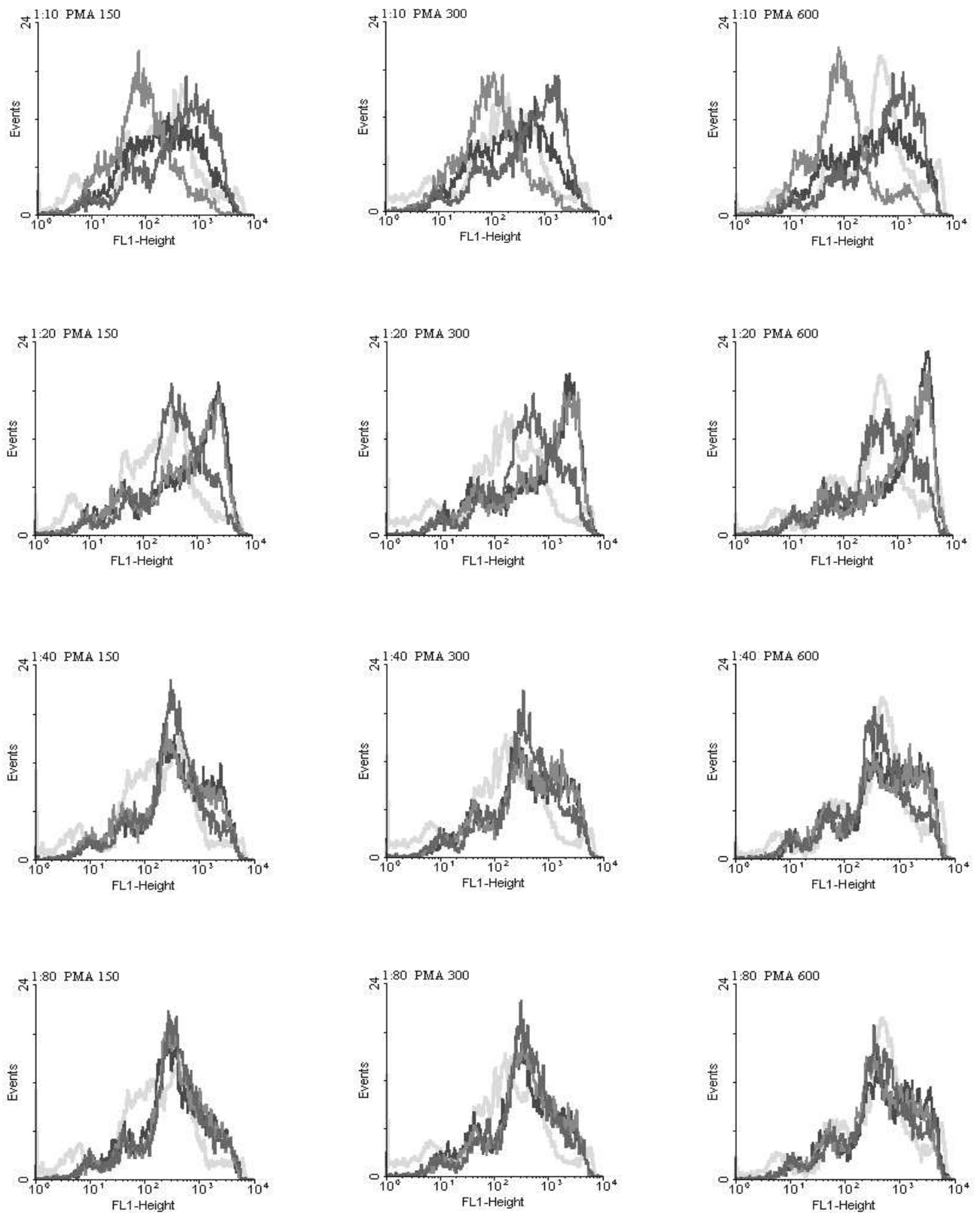
1 lentelė. ROS produkcijos tyrimo rezultatai esant skirtingoms laktobacilų metabolizmo produktų ir PMA koncentracijoms.

STATISTINIŲ SKAIČIAVIMŲ REZULTATAI										
		Vidutinis fluorescencinis intensyvumas			Palyginimas tarp laktobacilų ir MRS			Palyginimas tarp <i>L. p.</i> ir <i>L. f.</i>		
					%			%		
PMA (nM)		150	300	600	150	300	600	150	300	600
1 : 10	<i>L. p.</i>	499 ± 15	519 ± 41	654 ± 63	-32	-37	-28	92	89	134
	<i>L. f.</i>	260 ± 14	274 ± 7	279 ± 15	-64	-67	-69			
	MRS	733 ± 27	820 ± 16	910 ± 16						
1 : 20	<i>L. p.</i>	1060±38	1178 ± 71	1340±114	84	87	87	10	*8	*3
	<i>L. f.</i>	960 ± 38	1094 ± 73	1304 ± 75	67	74	82			
	MRS	575 ± 15	629 ± 8	716 ± 20						
1 : 40	<i>L. p.</i>	628 ± 14	704 ± 15	819 ± 41	20	23	29	4	*1	*-3
	<i>L. f.</i>	601 ± 17	697 ± 33	843 ± 32	15	21	32			
	MRS	522 ± 26	574 ± 17	636 ± 45						
1 : 80	<i>L. p.</i>	539 ± 5	572 ± 17	761 ± 92	13	16	43	*1	-3	*11
	<i>L. f.</i>	531 ± 5	593 ± 6	683 ± 7	11	20	28			
	MRS	477 ± 9	492 ± 8	534 ± 20						
RO ⁺		446 ± 11	439 ± 7	591 ± 72						

*- Statistiškai nepatikima ($p > 0,05$).

Literatūra

- Altman D.G. Practical statistics for medical research. 1999, Chapman and hall, London. 611p.
- Bogdan Ch., Rollinghoff M., Diefenbach A. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity // Current Opinion in Immunology. 2000. Vol. 12. P. 64-76.
- Brune B., Gotz C., Messmer U. K., Sandau K., Hirvonen M., R., Lapetina E.G. Superoxide formation and macrophage resistance to nitric oxide-mediated apoptosis // J. Biol Chem. 1997. Vol. 272. P. 7253-7258.
- Donnet-Hughes A., Rochat F., Serrant P., Aeschlimann J.M., Schiffrin E.J. Modulation of nonspecific mechanisms of defense by lactic acid bacteria: effective dose // J Dairy Sci. 1999. Vol. 82(5). P. 863-9.
- Ebringer L., Ferenčík M., Lahitova N., Kačani L., Michalkova D. Anti-mutagenic and immunostimulatory properties of lactic acid bacteria // World J. of Microbiol. and Biotechnol. 1995. Vol. 11. P. 294-298.
- Emmendorfer A., Hecht M., Lohmann-Matthes M.L., Roesler J. A fast and easy method to determine the production of reactive oxygen intermediates by human and murine phagocytes using dihydrorhodamine 123 // J. Immunol. Methods. 1990. Vol. 131. P. 269.
- Fadeel B., Ahlin A., Henter J.J., Orrenius S., Hampton M.B. // Involvement of caspases in neutrophil apoptosis: regulation by reactive oxygen species. Blood. 1998. Vol. 92. P. 4808-4818.
- Hansson M., Asea A., Ersson U., Hermodsson S., Hellstrand K. // Induction of apoptosis in NK cells by monocyte-derived reactive oxygen metabolites. J. Immunol. 1996. Vol. 156 P. 42-47.
- Mikalauskiene G., Pieškus J. Imunologijos praktikos darbai. Vilnius ACADEMIA, 1999. P. 9-11.
- Mikes Z., Ferencik M., Jahnova E., Ebringer L., Ciznar I. Hypercholesterolemic and immunostimulatory effects of orally applied Enterococcus faecium M-74 in man // Folia Microbiologica. 1995. Vol. 40. P. 639-646.
- Pulverer G., Ko H.L., Roszkowski W., Beuth J., Yassin A., Jeljaszewicz J. Digestive tract microflora liberates low molecular weight peptides with immunotriggering activity // Zentralbl Bakteriol. 1990. Vol. 272(3). P. 318-27.
- Pulverer G., Lioe Ko H., Beuth J. Microflora-associated defense stimulating factors // Scand J Gastroenterol Suppl. 1997. Vol. 222. P. 107-11.
- Rothe G., Oser A., Valet G. Dihydrorhodamine 123: a new flow cytometric indicator for respiratory burst activity in neutrophil granulocytes // Naturwissenschaften. 1988. Vol. 75. P. 354-355.
- Rothe G., Emmendorfer A., Oser A., Roesler J., Valet G. Flow cytometric measurement of the respiratory burst activity of phagocytes using dihydrorhodamine 123 // J. Immunol Methods. 1991. Vol. 138. P. 133.
- Šileika V., Sutkevičienė R., Lencner Ch., Lencner A. Lactobacillus fermentum U-5 pasas. 1991.
- Šileika V., Sutkevičienė R., Lencner Ch., Lencner A. Lactobacillus plantarum U-14 pasas. 1991.
- Tizard I. Veterinary Immunology. 2000. 483p.
- Trotter J., WinMDI, free software for the analysis of flow cytometric data. 1996 ftp.facs.scripps.edu.



1 pav. ROS gamybos histogramos esant skirtingoms laktobacilų metabolizmo produktų ir PMA koncentracijoms
 Lactobacillus plantarum
 Lactobacillus fermentum
 MRS
 R0⁺

Padėka. Dėkojame prof. Wolfgangui Leiboldui už metodinę ir materialinę pagalbą atliekant tyrimus
 2002 04 02