

КРАТКИЕ
СООБЩЕНИЯ

ИССЛЕДОВАНИЕ СЕКРЕЦИИ ВАЗОПРЕССИНА
И ОКСИТОЦИНА МИКРООРГАНИЗМАМИ

© 2022 г. Ю. В. Наточин^{а, б, *}, О. Г. Орлова^б, О. В. Рыбальченко^б, Е. И. Шахматова^а

^аИнститут эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, 194223 Россия

^бСПбГУ, Медицинский факультет, Санкт-Петербург, 199106 Россия

*e-mail: natochin1@mail.ru

Поступила в редакцию 30.06.2021 г.

После доработки 30.07.2021 г.

Принята к публикации 30.07.2021 г.

Установлена способность лактобактерий *Lactobacillus plantarum* 8РА-3 секретировать нейрогомоны аргинин вазопрессин и окситоцин при выращивании на плотной и в жидкой питательных средах. Найдена зависимость увеличения концентрации секретируемых гормонов от времени роста суспензионной культуры *L. plantarum* 8РА-3. Способность секретировать окситоцин слабо выражена у *Escherichia coli* М17, *Staphylococcus aureus* К4 и не обнаружена у *Micrococcus luteus* С6. Добавление этих гормонов и антагонистов их рецепторов в жидкую питательную среду не влияло на скорость роста клеток *L. plantarum* 8РА-3.

Ключевые слова: лактобактерии, нейрогомоны, вазопрессин, окситоцин

DOI: 10.31857/S0026365621060100

Согласно одной из теорий микроорганизмы появились на Земле около 4 млрд лет назад (Розанов, 2009). В процессе эволюции происходило их взаимодействие с прокариотами, простейшими и многоклеточными организмами (Oleskin, Shenderov, 2020). Микроорганизмы секретируют в окружающую среду физиологически активные вещества, в частности, окситоцин (ОТ), которые могут влиять как на функции многоклеточных организмов (Шпаков, 2009), так и на клетки самих бактерий (Бухарин и соавт., 2018). Известно, что в кровь млекопитающих секретируются такие нонапептиды, как аргинин вазопрессин (АВП) и ОТ, а микробиота оказывает влияние на различные физиологические функции человека (Peters, 2019). Для объяснения механизма увеличения концентрации ОТ в макроорганизме под влиянием бактерий была высказана гипотеза о том, что они выделяют метаболиты, способствующие секреции ОТ в мозг (Varian et al., 2017). Однако можно было предположить, что пробиотические бактерии сами способны в кишке секретировать нейрогомоны, которые всасываются в кровь человека.

Задача настоящей работы заключалась в выяснении возможности секреции бактериальными клетками АВП и ОТ и исследовании их влияния на рост бактерий.

Бактериальные культуры *Staphylococcus aureus* К4 и *Micrococcus luteus* С6 получены из коллекции НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, культура *Escherichia*

coli М17 выделена из препарата Колибактерин (“Микроген”, Россия), *Lactobacillus plantarum* 8РА-3 – из препарата Флорин® форте (“АВАН ООО”, Россия).

Культуры *E. coli* М17, *S. aureus* К4 и *M. luteus* С6 выращивали в жидкой (бульон Мюллера-Хинтона; “HiMedia”, Индия) и на плотной питательных средах (ППС) (агар Мюллера-Хинтона; “HiMedia”, Индия). Клетки *L. plantarum* 8РА-3 выращивали в жидкой (бульон Рогоза; “HiMedia”, Индия) и на плотной питательной среде (агар Рогоза; “HiMedia”, Индия). Выращивание бактерий проводили в стандартных условиях при температуре 37°C.

Рост бактерий анализировали, исследуя оптическую плотность суспензионных культур на спектрофотометре UNICO 2800 (Россия) при λ 560 нм, и при высеве проб методом Коха для определения числа колониеобразующих единиц (КОЕ) в 1 мл среды. Для иммуноферментного анализа гормонов пробы брали в исходном периоде, через 6 и 24 ч, центрифугировали 5 мин при 6 тыс. об./мин, отбирали супернатант и хранили при температуре –70°C. Концентрацию АВП и ОТ измеряли, используя наборы для иммуноферментного анализа “Enzo Life Sciences Inc.” (США). Считывание оптической плотности осуществляли в 96-луночных планшетах по методике тест-системы на автоматическом ридере ELx808 (“Bio-Tek Instruments”, США). Сравнение между группами проводили с использованием *t*-критерия.

Таблица 1. Секретия вазопрессина и окситоцина бактериальными клетками на плотной питательной среде

Виды бактерий	Время, ч	АВП пмоль/мл	ОТ пмоль/мл
<i>S. aureus</i> K4	6	0.0	0.040 ± 0.008
<i>M. luteus</i> C6		0.0	0.0
<i>L. plantarum</i> 8PA-3		0.092 ± 0.006	0.0
<i>E. coli</i> M17		0.0	0.0
<i>S. aureus</i> K4	24	0.0	0.0
<i>M. luteus</i> C6		0.0	0.032 ± 0.004
<i>L. plantarum</i> 8PA-3		0.214 ± 0.015	0.0
<i>E. coli</i> M17		0.0	0.056 ± 0.010

Примечание. Данные о концентрации гормонов представлены за вычетом показателей АВП и ОТ в питательной среде в исходном периоде.

рия Стьюдента для попарно связанных вариантов. Данные представлены в виде $M \pm m$, различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

В физиологических экспериментах использовали АВП и ОТ (“Sigma-Aldrich”, США), антагонист V_{1a} -рецепторов (Pmp-Tyr(Me)-Phe-Gln-Asn-Cys-Pro-Arg-Gly-NH₂) и антагонист рецепторов ОТ (Pmp-Tyr(Me)-Ile-Thr-Asn-Cys-Pro-Orn-OH) (“Wachem”, Швейцария). Растворы АВП, ОТ в концентрации 10^{-9} М или антагонистов их рецепторов 2×10^{-7} М добавляли в объеме 20 мкл в 2 мл бактериальной суспензии культур в интервалы времени 0, 3, 6 ч.

При выращивании *L. plantarum* 8PA-3 выявлена способность секретировать АВП и ОТ, концентрация которых в жидкой питательной среде возрастала пропорционально длительности выращивания (рис. 1). Секретия ОТ обнаружена и у *S. aureus* K4; концентрация этого гормона в среде в течение 6 ч с начала эксперимента возрастала до 0.035 ± 0.005 пмоль/мл. Дальнейший рост стафилококков в жидкой питательной среде не приводил к увеличению концентрации ОТ. В суспензионных культурах *M. luteus* C6 и *E. coli* M17 секретия ОТ не была выявлена.

Развитие на ППС биопленок у большинства исследуемых видов бактерий не сопровождалось секретией АВП, она была выявлена на всех этапах выращивания у лактобактерий, при этом образование этими клетками ОТ не отмечалось (табл. 1). В клетках *S. aureus* K4 секретия ОТ определялась к 6 ч выращивания культуры, но не была обнаружена при последующей инкубации. Напротив, на начальных этапах выращивания клеток *M. luteus* C6 на ППС секретия ОТ не определялась, однако наличие ОТ в небольшой кон-

центрации регистрировали к 24 ч развития культуры (табл. 1). Аналогичная картина отмечена и в отношении клеток *E. coli* M17.

Для изучения влияния АВП и ОТ на рост лактобактерий проводили эксперименты с добавлением этих гормонов или антагонистов в среду выращивания *L. plantarum* 8PA-3. Если секретируемые бактериями нейрогормоны способны регулировать их физиологические функции, то добавление ОТ или АВП в среду выращивания могло бы влиять на скорость роста культуры, а введение в эту же среду антагонистов рецепторов блокировать эффект секретируемых гормонов. В исследованиях с добавлением к бактериальным культурам антагонистов рецепторов этих нонапептидов не было обнаружено их влияния на скорость роста культур (табл. 2).

Известно, что у млекопитающих синтез АВП и ОТ происходит в нейросекреторных клетках гипоталамуса, они поступают в нейрогипофиз, откуда секретируются в кровь (Bankir et al., 2017). Эти гормоны влияют на разные подтипы V-рецепторов, меняя функцию клеток почечных канальцев (Natochin, Golosova, 2020). Ранее показано, что добавление лактобактерий *L. reuteri* в рацион мышей приводит к возрастанию концентрации ОТ в плазме крови, что объясняли стимуляцией ядер гипоталамуса метаболитами, продуцируемыми этими бактериями (Varian et al., 2017).

В нашей работе выявлена способность лактобактерий секретировать нейрогормоны, а концентрация ОТ в бактериальной культуре (рис. 1) и в сыровотке крови мышей оказалась сопоставимой (Poutahidis et al., 2013). АВП и ОТ, продуцируемые бактериями в полость кишки, могут влиять на функции организма-хозяина, что может быть обусловлено всасыванием ОТ или АВП из кишки в

Таблица 2. Влияние агонистов и антагонистов рецепторов окситоцина и вазопрессина на рост *L. plantarum* 8PA-3

Эксперимент ОООО	Продолжительность выращивания, ч		
	0	6	24
	КОЕ/мл		
Контроль	4.81×10^3	6.76×10^7	7.22×10^{10}
ОТ, 10^{-9} М	4.81×10^3	7.82×10^7	6.32×10^{10}
Антагонист ОТ, 2×10^{-7} М	4.80×10^3	4.32×10^7	7.73×10^{10}
АВП, 10^{-9} М	4.81×10^3	6.10×10^7	5.40×10^{10}
Антагонист АВП, 2×10^{-7} М	4.81×10^3	7.01×10^7	3.42×10^{10}

физиологически активной нерасщепленной форме гормона. Согласно стандартной схеме, белки и полипептиды в содержимом желудочно-кишечного тракта гидролизуются до аминокислот и дипептидов. Нами показано, что часть пептидов, в том числе нонапептиды, например, АВП, могут всасываться в кишке нерасщепленными и поступать в кровь человека и животных (Наточин и соавт., 2003). На основании этих данных можно предположить, что нейрогормоны, образуемые в кишке бактериями, могут всасываться в кровь. Это является еще одним аргументом в пользу широкого применения в пищу содержащих лактобактерии кисломолочных продуктов. По мнению Caldwell et al. (2017), лактобактерии, наряду с положительным действием на процесс пищеварения, по-видимому, способствуют секреции молока и влияют на другие физиологические функции благодаря поступлению в кровь женщин ОТ.

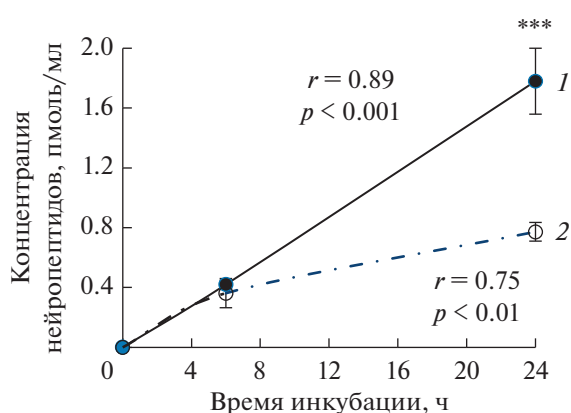


Рис. 1. Динамика секреции нонапептидов клетками *L. plantarum* 8PA-3 в суспензионной культуре. Абсцисса — время (ч), ордината — концентрация нонапептидов (пмоль/мл). Условные обозначения: 1 — АВП; 2 — ОТ. *** $p < 0.001$ — достоверность отличий секреции за 24 ч между АВП и ОТ; $n = 6$ для каждого опыта; r — коэффициент корреляции Пирсона.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках государственного задания № 075-00776-19-02.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов исследований с использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Бухарин О.В., Стадников А.А., Перукова Н.Б. Роль окситоцина и микробиоты в регуляции взаимодействий про- и эукариот при инфекции. Екатеринбург: УрО РАН, ФГБУН ОФИЦ ИКВС, 2018. 247 с.
- Наточин Ю.В., Пруцкова Н.П., Шахматова Е.И., Груздков А.А., Громова Л.В. Исследование возможности всасывания интактных нонапептидов в изолированной тонкой кишке крыс *in vivo* // Докл. АН. 2003. Т. 388. № 4. С. 558–561.
- Natochin Yu.V., Prutsikova N.P., Shakhmatova E.I., Gruzdkov A.A., Gromova L.V. Absorption of intact nonapeptides in an isolated loop of the rat small intestine: an *in vivo* study // Dokl. Biol. Sci. 2003. V. 388. P. 18–20.
- Розанов А.Ю. Псевдоморфозы по микробам в метеоритах // Проблемы происхождения жизни / Под ред. Розанова А.Ю., Лопатина А.В., Снытниковой В.Н. М.: ПИН РАН, 2009. С. 158–165.
- Шпаков А.О. Пептидные аутоиндукторы бактерий // Микробиология. 2009. Т. 78. С. 291–303.
- Shpakov A.O. Peptide autoinducers of bacteria // Microbiology (Moscow). 2009. V. 78. P. 291–303.
- Bankir L., Bichet D.G., Morgenthaler N.G. Vasopressin: physiology, assessment and osmosensation // J. Int. Med. 2017. V. 282. P. 284–297.

Caldwell H.K., Aulino E.A., Freeman A.R., Miller T.V., Witchev Sh.K. Oxytocin and behavior: Lessons from knock-out mice // *Dev. Neurobiol.* 2017. V. 77. P. 190–201.

Natochin Yu.V., Golosova D.V. Vasopressin receptor subtypes and renal sodium transport // *Vitamins and Hormones.* 2020. V. 113. P. 239–258.

Oleskin A.V., Shenderov B.A. Microbial Communication and Microbiota-Host Interactions / Biomedical, Biotechnological, and Biopolitical Implications. Hauppauge (New York): Nova Science Publ. 2020. 256 p.

Peters N. Identifying the role of vasopressin and oxytocin in the microbiota-gut-brain-behavior axis. Dissertation,

Georgia State University, 2019.

https://scholarworks.gsu.edu/neurosci_diss/45

Poutahidis Th., Kearney S.M., Levkovich T., Qi P., Varian B.J., Lakritz J.R., Ibrahim Y.M., Chatzigiagkos A., Alm E.J., Erdman S.E. Microbial symbionts accelerate wound healing via the neuropeptide hormone oxytocin // *PLoS One.* 2013. V. 8. P. 1–17. Art. e78898.

Varian B.J., Poutahidis Th., DiBenedictis B.T., Levkovich T., Ibrahim Y., Didyk E., Shikhman L., Cheung H.K., Hardas A., Ricciardi C.E., Kolandaivelu K., Veenema A.H., Alm E.J., Erdman S.E. Microbial lysate upregulates host oxytocin // *Brain Behav. Immun.* 2017. V. 61. P. 36–49.

Vasopressin and Oxytocin Secretion by Microorganisms

Yu. V. Natochin^{1, 2, *}, O. G. Orlova², O. V. Rybalchenko², and E. I. Shakhmatova¹

¹*Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg, 194223 Russia*

²*Medical Faculty, Saint-Petersburg State University, Saint-Petersburg, 199106 Russia*

*e-mail: natochin1@mail.ru

Received June 30, 2021; revised July 30, 2021; accepted July 30, 2021

Abstract—The ability of *Lactobacillus plantarum* strain 8RA-3 to secrete neurohormones arginine vasopressin and oxytocin when grown on solid and liquid nutrient media was established. An increase in the concentration of secreted hormones was found to depend on duration of the cultivation time of an *L. plantarum* 8PA-3 suspension culture. The ability to secrete oxytocin was poorly expressed in *Escherichia coli* M17 and *Staphylococcus aureus* K4 and was not found in *Micrococcus luteus* C6. The addition of these hormones and their receptor antagonists to the liquid nutrient medium did not affect the growth rate of *L. plantarum* 8PA-3 cells.

Keywords: lactic acid bacteria, neurohormones, vasopressin, oxytocin