

ИССЛЕДОВАНИЕ NO-СИНТАЗНОЙ АКТИВНОСТИ И ОБНАРУЖЕНИЕ NO-ЗАВИСИМОГО АНТИБАКТЕРИАЛЬНОГО ЭФФЕКТА В ПЕРВИЧНОЙ КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК ЭПИТЕЛИЯ МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ ЛЯГУШКИ

© Е. М. Фок, В. Т. Бахтеева, Е. А. Лаврова, С. Д. Николаева, Р. Г. Парнова¹

Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург;

¹ электронный адрес: parnova@iephb.ru

Ранее нами было показано, что в мочевом пузыре лягушки эндогенный оксид азота (NO) модулирует действие аргинин-вазотоцина в увеличении осмотической проницаемости эпителия. Задача данной работы заключалась в получении первичной культуры эпителиальных клеток мочевого пузыря лягушки с целью исследования механизмов регуляции NO-синтазы (NOS) и оценки ее активности в условиях *in vitro*. Наилучшим условием для культивирования клеток оказалось использование модифицированной среды L-15, содержащей 10 % эмбриональной бычьей сыворотки и 40 мкг/мл гентамицина, при комнатной температуре; в этих условиях в течение 8 сут 50 % клеток сохраняли свою жизнеспособность. Активность NOS оценивали по накоплению нитрит-ионов (NO_2^-) в культуральной жидкости, количество NO_2^- в присутствии 5 мМ L-NAME, ингибитора всех типов NOS, считали неспецифическим. Накопление NO_2^- было линейным во времени в течение 3 сут инкубации и тормозилось в присутствии вещества 1400W, ингибитора индуцибельной NOS (iNOS), или 7-нитроиндазола, ингибитора конститутивных NOS, в концентрациях 5—50 и 10—200 мкМ соответственно. В присутствии низких доз гентамицина (1—2 мкг/мл) через 1 сут культивирования клеток резко возрастало количество бактерий в культуральной среде, идентифицированных как *Escherichia coli* и *Acinetobacter sp.* Добавление в культуральную среду 5 мМ L-NAME приводило к увеличению количества бактерий в 1.5 и 2.5 раза при концентрациях гентамицина 2 и 1 мкг/мл соответственно. Таким образом, клетки эпителия мочевого пузыря лягушки обладают NO-зависимым антибактериальным эффектом, обеспечиваемым, по-видимому, усилением экспрессии iNOS. Полученные данные свидетельствуют о том, что первичная культура клеток эпителия мочевого пузыря лягушки является перспективной моделью для исследования роли NO и регуляции активности NOS, представляя особый интерес для изучения защитных эффектов NO в эпителиальных клетках.

Ключевые слова: оксид азота, NO-синтаза, первичная культура клеток, эпителий мочевого пузыря лягушки, антибактериальный эффект.

Принятые сокращения: NOS — синтаза оксида азота, iNOS — индуцибельная NOS, L-NAME — метиловый эфир нитро-L-аргинина.

Изолированный мочевой пузырь амфибий на протяжении многих лет является прекрасной экспериментальной моделью в исследованиях молекулярных механизмов регуляции осмотической проницаемости «плотного» эпителия. Работая на этом объекте, мы обнаружили, что важным модулятором действия антидиуретического гормона в увеличении осмотической проницаемости является оксид азота (NO) (Fock et al., 2004), ауто- и(или) паракринный биологический регулятор широкого спектра физиологических процессов. Внутриклеточное действие NO, продуцируемого при участии NO-синтазы (NOS) нейронального типа самими эпителиальными клетками мочевого пузыря, основано на стимуляции цитозольной гуанилатциклазы, увеличении уровня цГМФ и активация цГМФ-зависимой протеинкиназы в клетках эпителия, что приводит к торможению встраивания аквапоринов в апикальную мембрану клетки или снижению их транспортирующих свойств (Fock et al., 2004; Bachtееva et al., 2007).

Существование подобных типов быстрых сигнальных эффектов, сдвигающих количество продуцируемого NO в пределах небольшого диапазона (как правило, пикомолярного) и на короткий срок, было показано нами в экспериментах на суспензии свежeweделенных эпителиальных клеток. Однако гораздо большими регуляторными эффектами в отношении уровня продуцируемого NO обладают сигнальные каскады, контролируемые уровнем экспрессии NOS. Для изучения молекулярных механизмов регуляции экспрессии NOS *in vitro*, как правило, необходимо многочасовое культивирование клеток. Наибольший интерес представляет в этом отношении NO-синтаза индуцибельного типа (iNOS). Резкое увеличение ее экспрессии и соответственно значительное по величине и продолжительное во времени продуцирование NO лежат в основе обеспечения защитных функций клетки в ответ на действие патогенов различной природы (Knowles, Moncada, 1994; Moncada, Higgs, 1995; Guzik et al., 2003). Мукозный эпителий мочевого пузыря является барьером для про-

никновения инфекции, и у млекопитающих его клетки обладают механизмами распознавания бактериальных компонентов и имеют сложно организованную систему защиты от уропатогенных бактерий, важнейшую роль в которой играет iNOS (Olsson et al., 1998; Backhed et al., 2001; Poljakovic et al., 2001).

В связи с вышесказанным задачи настоящего исследования заключались в подборе культуральной системы, позволяющей обеспечить жизнеспособность изолированных эпителиальных клеток мочевого пузыря лягушки в течение нескольких дней эксперимента, оценке активности и типов NOS в культивируемых клетках и исследовании возможного NO-зависимого антибактериального эффекта клеток эпителия.

Материал и методика

Эксперименты проводили на самцах травяной лягушки *Rana temporaria* L. в период с октября по апрель. Лягушек отлавливали в естественных местах зимовки (на дне незамерзающих проточных водоемов) и содержали в лаборатории при 5 °С в емкостях с уровнем воды 1.0—1.5 см.

Выделение эпителиальных клеток. Внутреннюю полость мочевого пузыря у обездвиженных разрушением спинного мозга и вскрытых лягушек заполняли раствором, содержащим (в мМ): NaCl — 85, KCl — 4, NaHCO₃ — 17.5, KH₂PO₄ — 0.8, глюкоза — 10, ЭДТА — 2, pH 7.6 (раствора А). Пузыри перевязывали, извлекали и помещали в раствор того же состава с интенсивной аэрацией на 45 мин. К концу этого времени клетки спонтанно отделялись от стенок пузыря. Мукозные растворы, содержащие клетки от нескольких мочевого пузыря, объединяли, фильтровали сквозь четыре слоя газовой ткани и центрифугировали 10 мин при 100 g. Супернатант удаляли, клетки ресуспендировали в растворе, содержащем (в мМ): NaCl — 85, KCl — 4, NaHCO₃ — 17.5, KH₂PO₄ — 0.8, CaCl₂ — 1.5, MgCl₂ — 0.8, глюкоза — 10, pH 7.6 (раствор В), затем инкубировали в течение 30 мин. Из одной лопасти мочевого пузыря можно было получить от 2 до 4 млн клеток. Объем раствора для ресуспендирования подбирали таким образом, чтобы концентрация клеток составляла примерно $7 \cdot 10^3$ — $8 \cdot 10^3$ кл./мкл. Подсчет количества клеток осуществляли в камере Горяева. Число поврежденных клеток определяли по поглощению трипанового синего (0.2 %); в свежeweделенной суспензии оно обычно не превышало 10 % от общего количества клеток.

Получение первичной культуры клеток эпителия мочевого пузыря. Для этих экспериментов эпителиальные клетки получали так, как описано выше, за исключением того, что выделенные клетки дополнительно промывали 7—8 раз стерильным раствором В, содержащим 40 мкг/мл гентамицина. Осадок клеток ресуспендировали в модифицированной стерильной культуральной среде следующего состава: 1 часть среды L-15 (Leibovitz) (Sigma, США), 0.39 части H₂O, 10 % эмбриональной бычьей сыворотки (Биолот, Россия) и гентамицин (40 мкг/мл). Осмоляльность среды составляла 230 мосм/кг H₂O. Используемая нами среда L-15 рекомендована для культивирования клеток в условиях газообмена с воздухом, поэтому мы не использовали CO₂-инкубатор. Для анализа жизнеспособности клеток их культивировали в 96-луночных стерильных плашках (Sarstedt, Германия) во влажной камере при комнатной температуре и при 10 °С, плотность клеток составляла от $1 \cdot 10^5$ до

$5 \cdot 10^5$ на 1 см². Культуральную среду меняли дважды в неделю. Жизнеспособность клеток оценивали по отсутствию поглощения трипанового синего (0.2 %), который добавляли непосредственно в лунку.

Определение содержания нитритов в культуральной жидкости. Аликвоты клеточной суспензии объемом 250 мкл переносили в стерильных условиях в лунки 24-луночного планшета (Sarstedt, Германия) и оставляли во влажной камере при комнатной температуре. Концентрация клеток в лунке составляла $(7-8) \cdot 10^3$ кл. в 1 мкл. Ингибиторы NOS — метиловый эфир нитро-L-аргинина (L-NAME), 7-нитроиндазол (Sigma, США) и вещество 1400W (Biomol, США) — добавляли в лунки одновременно с внесением суспензии клеток. После окончания времени инкубации суспензию из лунок переносили в пробирки и центрифугировали при 100 g. Концентрацию нитритов определяли в супернатанте с помощью реактива Грисса (Green et al., 1982). Для этого аликвоту супернатанта смешивали с равным объемом смеси 1%-ного сульфаниламида и 0.1%-ного N-(1-нафтил)-этилендиамина в соотношении 1 : 1. Оптическую плотность измеряли на планшетном фотометре при длине волны 570 нм, концентрацию нитритов оценивали по калибровочной кривой, построенной по стандартным растворам нитрита натрия, и выражали в пмолях на 10⁶ клеток. В ряде экспериментов определяли суммарно нитриты и нитраты с помощью коммерческих наборов (Assay Designs, США), превращая нитраты в нитриты с помощью нитратредуктазы в присутствии НАДФН.

Оценка NO-зависимого антибактериального эффекта клеток эпителия. Полученную клеточную суспензию выдерживали 40 мин при комнатной температуре в отсутствие гентамицина, а затем культивировали клетки при небольших концентрациях антибиотика (0.04—4.00 мкг/мл), для того чтобы допустить рост бактерий, изначально присутствующих в суспензии выделенных эпителиальных клеток. Ингибитор всех типов NOS — L-NAME (5 мМ) — добавляли одновременно с внесением клеточной суспензии в лунки. Через 1 сут инкубации собирали содержимое лунок, клетки выделяли центрифугированием при 100 g, супернатант откручивали еще раз при 1000 g. Часть супернатанта использовали для определения количества нитритов, в оставшемся объеме ресуспендировали осадок. Количество бактерий в полученной суспензии оценивали нефелометрически, определяя оптическую плотность *D* при длине волны 405 нм. Для того чтобы убедиться в том, что L-NAME напрямую не стимулирует рост бактерий, аликвоты бактериальной суспензии помещали в лунки со средой в присутствии L-NAME или без него; количество бактерий оценивали на следующий день нефелометрически.

В отдельных экспериментах проверяли соответствие данных нефелометрии подсчету количества бактерий, произведенному стандартным методом бактериологического посева на агаре Эндо. Чашки инкубировали при 37 °С, количество колоний подсчитывали на следующие сутки после посева. Видовую принадлежность бактерий определяли с помощью бактериологического посева на селективных средах.

Результаты и обсуждение

Для культивирования клеток мы использовали модифицированную культуральную среду L-15 (Leibovitz), осмоляльность которой составляла 230 мосм/кг, что соот-

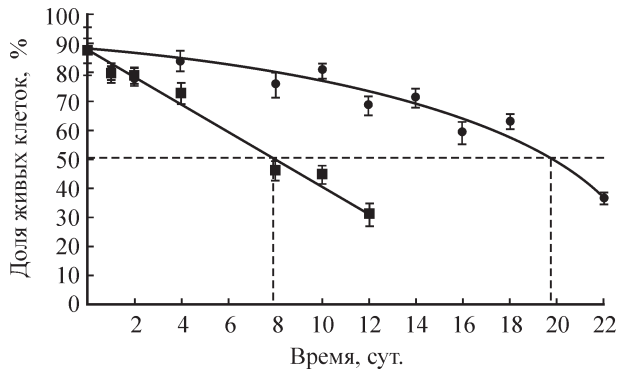


Рис. 1. Выживаемость изолированных эпителиальных клеток мочевого пузыря лягушки, определяемая по отсутствию окрашивания трипановым синим, при многосуточном культивировании клеток при комнатной температуре (квадраты) и при 10 °C (кружки).

Здесь и на всех рисунках данные представлены в виде средних значений и их среднеквадратичных ошибок измерений; $n = 10-12$ подсчетов в разных полях зрения.

ветствует осмоляльности плазмы крови лягушки *Rana temporaria* L. Уже через 1—2 ч после помещения суспензии в лунки клетки обнаруживают способность прикрепляться к поверхности пластика и распластываться. На следующие сутки клетки формируют монослой при плотности клеток от $1 \cdot 10^5$ до $5 \cdot 10^5$ на 1 см^2 поверхности лунки. Из различных сывороток, которые мы использовали в предварительных экспериментах, в том числе и сыворотки крови лягушек, наилучшей для распластывания клеток оказалась эмбриональная бычья сыворотка (10 %), которую и использовали в дальнейших экспериментах.

Использованная культуральная система позволяла клеткам сохранять хорошую жизнеспособность: как показала окраска трипановым синим, при комнатной температуре 50 % клеток оставались живыми в течение 8 ч культивирования, а при температуре 10 °C — в течение 20 сут (рис. 1).

Оценку NO-синтазной активности клеток первичной культуры проводили по измерению уровня нитритов в культуральной жидкости. Образовавшийся под действием NO-синтазы оксид азота в водном растворе превращается в нитрит-ион (NO_2^-). Поскольку нитрит-ионы могут легко окисляться в нитрат-ионы, более информативным было бы определение суммарного уровня NO_2^- и NO_3^- , однако обычно, оценивая активность NO-синтазы, ограничиваются определением нитрит-ионов. Наши эксперименты показали, что уровень NO_3^- в культуральной жидкости, определяемый с помощью нитратредуктазы в присутствии НАДФН, коррелирует с уровнем NO_2^- и составляет около 50 % от суммы обоих ионов. В дальнейших экспериментах мы оценивали NO-синтазную активность только по количественному определению уровня NO_2^- .

Поскольку нитрит-ионы могут образовываться не только с помощью NO-синтазного пути, для оценки их продукции NOS-зависимым путем мы использовали неселективный ингибитор всех изоформ NO-синтазы — *L*-NAME, принимая уровень нитрит-ионов в его присутствии как неспецифический, который и вычитали из значений контрольных проб. Вычисляемая таким образом NOS-зависимая доля нитрит-ионов от их общего количества колебалась в различных экспериментах от 60 до

80 % при использовании *L*-NAME в концентрации 5 мМ. Таким образом, преобладающая часть NO_2^- в культуральной среде появляется в результате функционирования NO-синтазы. Общее количество нитрит-ионов, продуцируемых культивируемыми эпителиальными клетками, опосредованное активностью NO-синтазы, линейно зависело от концентрации клеток в лунке (рис. 2, а).

Исследование количества продуцируемых нитрит-ионов в зависимости от продолжительности культивирования показало, что в течение первых 3 сут накопление как суммарных, так и NOS-зависимых нитрит-ионов растет линейно (рис. 2, б). Существенное влияние на продукцию оказывала температура культивирования клеток: при снижении температуры до 12 °C их общее количество снижалось в 2.7 раза, а NOS-зависимое — более чем в 5 раз (данные не показаны).

Для идентификации изоформ NO-синтазы, обеспечивающих накопление нитрит-ионов в первичной культуре клеток эпителия мочевого пузыря, мы использовали специфические ингибиторы, добавляя их в лунки одновременно с внесением суспензии клеток. Накопление NO_2^- тормозилось в присутствии 7-нитроиндазола (ингибитора конститутивных NO-синтаз) в концентрационном диапазоне 10—200 мкМ. Аналогичным эффектом обладал высокоселективный ингибитор NO-синтазы индуцибельного типа — 1400W в диапазоне концентраций 5—50 мкМ (рис. 3).

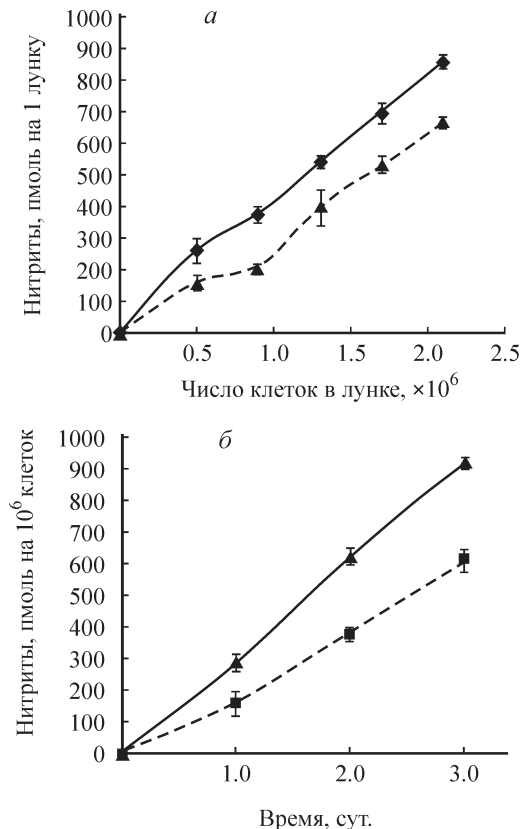


Рис. 2. Содержание NO_2^- в культуральной среде первичной культуры клеток эпителия мочевого пузыря лягушки.

а — зависимость уровня NO_2^- от количества клеток в лунке в течение 1-х сут культивирования; б — динамика увеличения количества NO_2^- в течение 3 сут культивирования. Сплошная линия — общее количество NO_2^- , штриховая — NOS-зависимое количество NO_2^- , определяемое как разность между их общим количеством и тем уровнем нитрит-ионов, которые продуцируются в присутствии 5 мМ *L*-NAME (ингибитора NOS); $n = 5$.

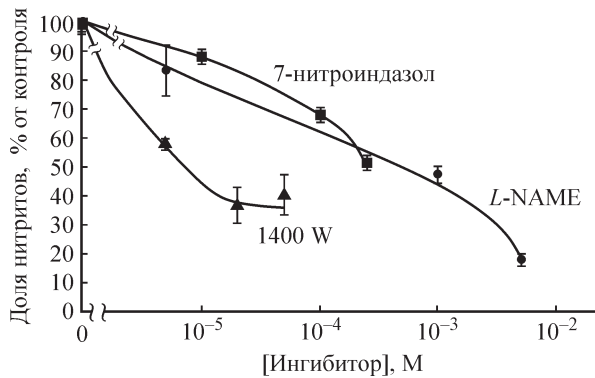


Рис. 3. Влияние различных ингибиторов NO-синтаз на уровень продуцируемых нитрит-ионов клетками первичной культуры эпителия мочевого пузыря лягушки в течение 1-х сут культивирования.

В экспериментах с 7-нитроиндазолом в контрольные пробы добавляли растворитель (этанол), концентрация которого не превышала 0.5 %; $n = 5$.

Присутствие нейрональной NOS в эпителии мочевого пузыря лягушки было продемонстрировано нами ранее при измерении активности NOS в свежесделанных клетках и подтверждено методами иммуногистохимии и иммуноблоттинга (Бахтеева и др., 2006; Bachtееva et al., 2007). Влияние 7-нитроиндазола на продукцию NO₂ свидетельствует о том, что культивируемые клетки не утрачивают способности экспрессировать эту изоформу фермента.

Эффективность влияния 1400W на продукцию нитрит-ионов культивируемыми клетками свидетельствует о наличии iNOS, роль которой весьма многообразна, однако в большинстве случаев связана с обеспечением клеток защитными свойствами. Известно, что в клетках эпителия мочевого пузыря млекопитающих присутствует iNOS, экспрессия которой возрастает в ответ на добавление цитокинов, липополисахаридов и уропатогенной *E. coli* (Olsson et al., 1998; Poljakovic et al., 2001, 2002; Saban et al., 2001). Введение в мочевой пузырь млекопитающих бактерий резко стимулирует синтез NO клетками мукозного эпителия (Lundberg et al., 1996). В связи с этими

данными представляло интерес выяснить, присутствует ли бактериальная флора в полости мочевого пузыря в естественных условиях и обладают ли клетки эпителия мочевого пузыря лягушки NO-зависимым антибактериальным эффектом.

Анализ содержимого мочевого пузыря лягушки, отобранного в стерильных условиях, выявил с помощью стандартного метода бактериологического посева присутствие бактериальной флоры у 6 лягушек из 10 исследованных. Интересно, что присутствие бактерий всегда коррелировало с наличием в полости пузыря паразитических беспозвоночных, представителей плоских червей.

Наличие бактерий и обнаруженный нами эффект 1400W на продукцию нитритов клетками первичной культуры указывают на то, что клетки мукозного эпителия мочевого пузыря лягушки, возможно, обладают NO-зависимыми механизмами антибактериальной защиты. Для выяснения этого вопроса мы провели эксперименты с культивированием эпителиальных клеток в присутствии низких доз гентамицина, что неизбежно допускает рост бактерий. Мы полагаем, что эти бактерии попадают в среду вместе с выделяемыми эпителиальными клетками, так как при получении первичной культуры почти невозможно избежать бактериальной контаминации. При снижении концентрации антибиотика от 4.00 до 0.04 мкг/мл пропорционально увеличивается количество бактерий в культуральной среде, определяемых нефелометрически, за 1 сут культивирования (рис. 4, а). Анализ состава бактериальной флоры выявил массивный прирост *E. coli* и грамотрицательной аэробной палочки *Acinetobacter sp.* Оба вида бактерий являются уропатогенными для млекопитающих (Gospodarek et al., 1991; Svanborg, Godaly, 1997) и чувствительны к гентамицину. Добавление в культуральную среду, содержащую гентамицин и ингибитор NO-синтаз L-NAME (5 мМ), приводило к значительному увеличению количества бактерий (в ед. D) от 0.049 ± 0.006 и 0.042 ± 0.005 в контроле до 0.071 ± 0.005 и 0.107 ± 0.019 в присутствии соответственно 2 и 1 мкг/мл гентамицина (рис. 4, б). Данные нефелометрии полностью коррелировали с оценкой количества бактерий, определяемых по подсчету числа колоний после посева аликвоты суспензии на агар. L-NAME сам по себе не оказывал влияния на рост бактерий, его эффект проявлялся

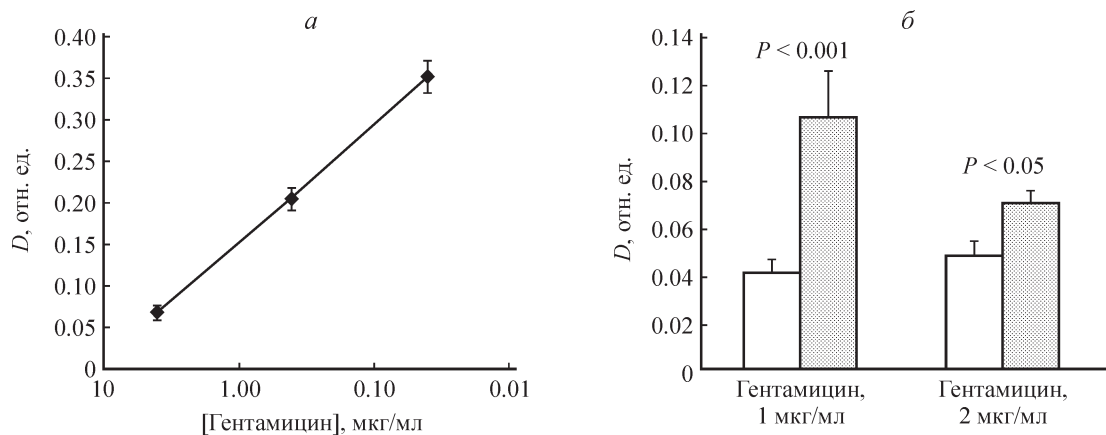


Рис. 4. Оценка количества бактерий в лунке в течение 1-х сут культивирования эпителиальных клеток в присутствии низких концентраций гентамицина.

а — зависимость количества бактерий от концентрации гентамицина; б — влияние 5 мМ L-NAME на количество бактерий при использовании гентамицина в концентрациях 1 и 2 мкг/мл. Белые столбики — контроль, заштрихованные — в присутствии L-NAME; данные представлены в виде среднего значения оптической плотности D из 4 определений.

только в присутствии культивируемых эпителиальных клеток. L-NAME также не оказывал эффекта на жизнеспособность клеток, определяемую по окраске трипановым синим. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что клетки эпителия мочевого пузыря лягушки обладают NO-зависимым антибактериальным эффектом.

Мы предполагаем, что ведущая роль в обеспечении этого процесса принадлежит iNOS, усиление экспрессии которой в ответ на воспалительные стимулы (различные цитокины и продукты бактериального происхождения, такие как липополисахариды и липотейхоевая кислота) и соответственно увеличение продукции оксида азота показано для многих типов эпителиальных клеток (Mohaupt et al., 1995; Guo et al., 1997; Guzik et al., 2003; Malladi et al., 2004). В основе NO-зависимого антибактериального (бактериостатического или бактерицидного) действия клеток эпителия мочевого пузыря лягушки может лежать большое разнообразие различных механизмов, приводящих к NO-индуцируемому повреждению ДНК, белков и липидов бактериальной клетки. Они включают в себя образование активных форм азота, вступающих во взаимодействие с активными формами кислорода, прямые взаимодействия NO с различными реакционно-способными группами в белковых молекулах, в том числе S-нитрозилирование тиолов, и многое другое (см. обзор: Fang, 1997). В отношении *E. coli* было показано, что S-нитрозотиолы обладают бактериостатическим действием, а пероксинитрит, образующийся при взаимодействии NO с супероксидным анион-радикалом, — бактерицидным (Pacelli et al., 1995).

Выяснение молекулярных механизмов, обеспечивающих NO-зависимый антибактериальный эффект клеток эпителия мочевого пузыря лягушки, требует дальнейших исследований; обсуждение этого вопроса выходит за рамки данной публикации. Открытым остается вопрос о том, клетки какого типа обеспечивают высвобождение NO в ответ на действие бактериальных стимулов. Суспензия клеток, на которой проводились наши эксперименты, является гетерогенной, так как в эпителии мочевого пузыря лягушек описаны клетки нескольких типов — гранулярные, составляющие около 80 % от всей популяции, клетки, богатые митохондриями, так называемые бокаловидные, и базальные, которые, возможно, представляют собой молодые недифференцированные эпителиальные клетки (Choi, 1963; Наточин, Чапек, 1976). Кроме того, в суспензии изолированных клеток возможно присутствие «профессиональных» иммунокомпетентных клеток (моноцитов/макрофагов), которые могут участвовать в обеспечении NO-зависимого антибактериального эффекта. Однако полученные нами результаты несомненно свидетельствуют о том, что клетки мукозного эпителия мочевого пузыря лягушки обладают мощным антибактериальным эффектом, и что первичная культура клеток эпителия мочевого пузыря лягушки является перспективной экспериментальной моделью для исследования роли NO и молекулярного механизма его действия, представляя особый интерес для изучения защитных эффектов NO в эпителиальных тканях.

Авторы выражают благодарность Л. С. Гретченко (кафедра эпидемиологии С.-Петербургской медицинской академии им. И. И. Мечникова) за помощь в определении состава бактерий, а также А. М. Горбушину (ИЭФБ им. И. М. Сеченова РАН) за ценные советы.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 08-04-00837).

Список литературы

- Бахтеева В. Т., Фок Е. М., Лаврова Е. А., Горбушин А. М., Романова И. В., Николаева С. Д., Парнова Р. Г. 2006. Обнаружение NO-синтазной активности в клетках мукозного эпителия мочевого пузыря лягушки. Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. 92 (8) : 1022—1028.
- Наточин Ю. В., Чапек К. 1976. Методы исследования транспорта воды и ионов. Л.: Наука. 220 с.
- Bachteeva V., Fock E., Lavrova E., Nikolaeva S., Gambaryan S., Parnova R. 2007. Prostaglandin E₂ inhibits vasotocin-induced osmotic water permeability in the frog urinary bladder by EP₁-receptor-mediated activation of NO/cGMP pathway. Amer. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 293 : R528—R537.
- Bäckhed F., Söderhäll M., Ekman P., Normark S., Richter-Dahlfors A. 2001. Induction of innate immune responses by *Escherichia coli* and purified lipopolysaccharide correlate with organ- and cell-specific expression of Toll-like receptors within the human urinary tract. Cell Microbiol. 3 : 153—158.
- Choi J. K. 1963. The fine structure of the urinary bladder of the toad, *Bufo marinus*. J. Cell Biol. 16 : 53—72.
- Fang F. C. 1997. Mechanisms of nitric oxide-related antimicrobial activity. J. Clin. Invest. 99 : 2818—2825.
- Fock E. M., Lavrova E. A., Bachteeva V. T., Chernigovskaya E. V., Parnova R. G. 2004. Nitric oxide inhibits arginine-vasotocin-induced increase of water osmotic permeability in frog urinary bladder. Pflugers Arch. 448 : 197—203.
- Gospodarek E., Sieradzka E., Bugalski R. 1991. Presence of various *Acinetobacter* species in urinary tract infections. Med. Dosw. Mikrobiol. 43 : 111—118.
- Green L. C., Wagner D. A., Glogowski J., Skipper P. L., Wishnok J. S., Tannenbaum S. R. 1982. Analysis of nitrate, nitrite and [15N] nitrate in biological fluids. Anal. Biochem. 126 : 131—138.
- Guo F. H., Uetani K., Haque S. J., Williams R. R., Dweik R. A., Thunnissen F. B., Calhoun W., Erzurum S. C. 1997. Interferon gamma and interleukin 4 stimulate prolonged expression of inducible nitric oxide synthase in human airway epithelium through synthesis of soluble mediators. J. Clin. Invest. 100 : 829—838.
- Guzik T. J., Korb R., Adamek-Guzik T. 2003. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. J. Physiol. Pharmacol. 54 : 469—487.
- Knowles R. G., Moncada S. 1994. Nitric oxide synthases in mammals. Biochem. J. 298 : 249—258.
- Lundberg J. O., Ehren I., Jansson O., Adolfsson J., Lundberg J. M., Weitzberg E., Alving K., Wiklund N. P. 1996. Elevated nitric oxide in the urinary bladder in infectious and noninfectious cystitis. Urology. 48 : 700—702.
- Malladi V., Puthenedam M., Williams P. H., Balakrishnan A. 2004. Enteropathogenic *Escherichia coli* outer membrane proteins induce iNOS by activation of NF-κB and MAP kinases. Inflammation. 28 : 345—353.
- Mohaupt M. G., Schwobel J., Elzie J. L., Kannan G. S., Kone B. C. 1995. Cytokines activate inducible nitric oxide synthase gene transcriptional in inner medullary collecting duct cells. Amer. J. Physiol. 268 : F770—F777.
- Moncada S., Higgs E. A. 1995. Molecular mechanisms and therapeutic strategies related to nitric oxide. FASEB J. 9 : 1319—1330.
- Olsson L. E., Wheeler M. A., Sessa W. C., Weiss R. M. 1998. Bladder instillation and intraperitoneal injection of *Escherichia coli* lipopolysaccharide up-regulate cytokines and iNOS in rat urinary bladder. J. Pharmacol. Exp. Ther. 284 : 1203—1208.
- Pacelli R., Wink D. A., Cook J. A., Krishna M. C., DeGraff W., Friedman N., Tsokos M., Samuni A., Mitchell J. B. 1995. Nitric oxide potentiates hydrogen peroxide-induced killing of *Escherichia coli*. J. Exp. Med. 182 : 1469—1479.

Poljakovic M., Karpman D., Svanborg C., Persson K. 2002. Human renal epithelial cells express iNOS in response to cytokines but not bacteria. *Kidney International*. 61 : 444—455.

Poljakovic M., Svensson M.-L., Svanborg C., Johansson K., Larsson B., Persson K. 2001. *E. coli*-induced inducible nitric

oxide synthase and cyclooxygenase expression in the mouse bladder and kidney. *Kidney International*. 59 : 893—904.

Svanborg C., Godaly G. 1997. Bacterial virulence in urinary tract infection. *Infect. Dis. Clin. North Amer.* 11 : 513—529.

Поступила 28 I 2008

NO-SYNTHASE ACTIVITY IN PRIMARY CULTURED FROG URINARY BLADDER EPITHELIAL CELLS AND NO-DEPENDENT ANTIMICROBIAL EFFECT

E. M. Fock, V. T. Bachtееva, E. A. Lavrova, S. D. Nikolaeva, R. G. Parnova¹

I. M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry RAS, St. Petersburg;

¹e-mail: parnova@iephb.ru

We have shown previously that endogenous NO modulates the effect of arginine-vasotocin on the increase in the osmotic water permeability of the frog urinary bladder epithelium. The aim of the present work was to develop a procedure of cultivation of epithelial cells from the frog urinary bladder as a primary culture in order to study *in vitro* the cellular production of NO and its regulation. Isolated cells were cultivated in modified L-15 medium with 10 % FBS and gentamycin (40 µg/ml) at room temperature. Under these conditions, at least 50 % cells kept their viability until 8 days of incubation. NO-synthase (NOS) activity was estimated as nitrite (NO₂⁻) accumulation in culture medium; NO₂⁻ concentration in the presence of L-NAME, inhibitor of all NOS types, was considered as NOS-independent and was subtracted from each value. The nitrite accumulation was linear in time during 3 days of cultivation and was inhibited by 1400W, inducible NOS (iNOS) inhibitor, and 7-nitroindazole, constitutive NOS's inhibitor, at doses 5—50 and 10—200 µM, respectively. One-day incubation of the cells in the medium with low concentration of gentamycin (1 or 2 µg/ml) led to the significant increase in amount of bacterial in cultured fluid identified as *E. coli* and *Acinetobacter sp.* Addition of L-NAME (5 · 10⁻³ M) to the medium potentiated the bacteria growth 1.5- and 2.5-times in the presence of 2 and 1 µg gentamycin/ml, respectively. Thus, epithelial cells from the frog urinary bladder possess NO-dependent antibacterial effect which is probably provided by induction of iNOS expression. Taken together, these data demonstrate that the primary culture of the frog urinary bladder epithelial cells is a perspective experimental model for the study of regulation of NOS activity and NO production being of particular interest in relation to the defense effect of NO in epithelia.

Key words: nitric oxide, NO-synthase, primary cell culture, frog urinary bladder epithelium, antibacterial effect.