

УДК 547.415.5

DOI: 10.14427/jipai.2022.4.82

Дозозависимое влияние бактериальных полиаминов на жизнеспособность лейкоцитов периферической крови человека

И.А. Морозов, А.П. Годовалов, Т.И. Карпунина

Пермский государственный медицинский университет им. акад. Е.А. Вагнера, Пермь, Россия

Dose-dependent effect of bacterial polyamines on the viability of human peripheral blood leukocytes

I.A. Morozov, A.P. Godovalov, T.I. Karpunina

Acad. E.A. Wagner Perm State Medical University, Perm, Russia

Аннотация

В последнее время много внимания уделяется роли микробных сообществ в развитии патологических состояний человека. Однако, как правило, такие исследования касаются лишь таксономической характеристики микробиоты. В свою очередь относительно мало уделяется внимания метаболитам бактерий, которые помимо межмикробных коммуникаций участвуют во взаимодействии с эукариотическими клетками. Цель исследования – изучение влияния кадаверина и путресцина на жизнеспособность лейкоцитов периферической крови человека. В исследовании использовали пробы периферической крови 15 практически здоровых добровольцев, из которых путём градиентного центрифугирования получали мононуклеарные лейкоциты. Клеточную суспензию инкубировали при 37 °С в условиях 5 % CO₂ в течение 72 ч с полиаминами в концентрациях 5, 25, 50, 75 и 100 ммоль/л. По окончании инкубации в лунках подсчитывали общее число клеток, в том числе количество жизнеспособных, в тесте с 0,1 % раствором трипанового синего. В ходе проведённых исследований показано, что увеличение концентрации путресцина коррелирует с уменьшением общего числа клеток ($r = -0,75$). В пробах с концентрациями кадаверина 5 и 25 ммоль/л общее число клеток увеличилось до 3014 ± 1312 и 4000 ± 1292 в 1 мкл соответственно, против 1990 ± 1036 в 1 мкл в контрольных пробах ($p < 0,05$). Однако в пробах с большим содержанием кадаверина повышения общего количества лейкоцитов не зарегистрировано. В целом полиамины бактериального происхождения оказывают разнонаправленное действие на жизнеспособность мононуклеарных лейкоцитов. Действие путресцина, вероятно, обусловлено накоплением токсичных продуктов при его метаболизме лейкоцитами. В свою очередь кадаверин в малых концентрациях может включаться в регуляцию жизненного цикла клеток.

Ключевые слова

Полиамины бактериального происхождения, путресцин, кадаверин, мононуклеарные лейкоциты.

Summary

Recently, much attention has been paid to the role of microbial communities in the development of human pathological conditions. However, as a rule, such researches concern only the taxonomic characteristics of the microbiota. In turn, relatively little attention is paid to bacterial metabolites, which, in addition to intermicrobial communications, are involved in interaction with eukaryotic cells. The aim of investigation was to study the effect of cadaverine and putrescine on the viability of human peripheral blood leukocytes. We used peripheral blood samples from 15 healthy volunteers, from which mononuclear leukocytes were obtained by gradient centrifugation. The cell suspension was incubated at 37 °C under 5 % CO₂ for 72 h with polyamines at concentrations of 5, 25, 50, 75, and 100 mmol/l. At the end of the incubation in the wells, the total number of cells was counted, including the number of viable cells in the test with 0.1 % trypan blue solution. During investigation, it was shown that an increase in the concentration of putrescine correlates with a decrease in the total number of cells ($r = -0.75$). In samples with cadaverine concentrations of 5 and 25 mmol/l, the total number of cells increased to 3014 ± 1312 and 4000 ± 1292 in 1 μ l, respectively, against 1990 ± 1036 in 1 μ l in control samples ($p < 0.05$). However, in samples with a high content of cadaverine, an increase in the total number of leukocytes was not registered. In general, polyamines of bacterial origin have a multidirectional effect on the viability of mononuclear leukocytes. The action of putrescine is probably due to the large accumulation of toxic products during its metabolism by leukocytes. In turn, low concentrations of cadaverine can be involved in the regulation of the cell life cycle.

Keywords

Bacterial polyamines, putrescine, cadaverine, mononuclear leukocytes.

В разных локусах организма человека обитает множество микроорганизмов, совокупная численность которых на порядок превышает количество эукариотических клеток. Более того, в последнее время наблюдается тенденция к увеличению доли прокариот. Известно, что избыточный рост микроорганизмов может привести к ряду негативных последствий, например, нарушению всасывания витаминов, мальабсорбции жиров и другим [1].

Эволюционно выработанная умеренная агрессивность позволяет условно патогенным микроорганизмам сосуществовать с человеком, участвовать в формировании биоценозов, в том числе на слизистых оболочках и коже. Среди симбионтов насчитывают более 500 видов, однако далеко не у всех из них изучены характеристики и роль в патологии. Тесное взаимодействие с микрофлорой не может быть индифферентным для человека [2]. Условно патогенные бактерии способны вызывать гнойно-воспалительные заболевания, например, инфекции кожи и мягких тканей, пиелонефрит, пневмонию, колит. С другой стороны, микрофлора биотопов влияет на состояние иммунореактивности, регулируя адекватность иммунного ответа на инфекцию. Для метаболитов бактерий – формиата, ацетата, бутирата, пропионата, молочной и муравьиной кислот – описаны механизмы влияния и эффекты на организм человека, но относительно мало сведений о полиаминах – путресцине и кадаверине [3, 4]. Интерес к этой группе биогенных аминов обусловлен в первую очередь их способностью влиять практически на любые типы клеток. Во-вторых, для бактериальных полиаминов характерно рецептор-независимое действие на клетки [5].

Кадаверин и путресцин относятся к диаминам, синтез которых выявлен у микроорганизмов при декарбоксилировании аминокислот – лизина и орнитина [6]. Такая ситуация наблюдается, например, в очаге воспаления, где синтез этих поликатионов бактериями, как правило, усиливается [7].

В этой связи представляет интерес изучение влияния кадаверина и путресцина на жизнеспособность лейкоцитов периферической крови человека.

Материалы и методы

В исследовании использовали пробы периферической крови 15 практически здоровых добровольцев. С помощью градиентного (фиколл-верографин; $\rho = 1,077 \text{ г/см}^3$) центрифугирования выделяли популяцию мононуклеарных

лейкоцитов. Клетки трижды отмывали свежим охлажденным раствором Хенкса (Россия) и доводили их содержание до 2×10^6 клеток/мл. После этого клеточную суспензию помещали в лунки круглодонного планшета с предварительно внесёнными полиаминами в концентрациях 5, 25, 50, 75 и 100 ммоль/л. В качестве контроля использовали лунки, не содержащие полиаминов. Планшеты инкубировали в термостате при 37°C в условиях 5 % CO_2 в течение 72 ч. По окончании инкубации в лунках подсчитывали общее число клеток, в том числе количество жизнеспособных, в тесте с 0,1 % раствором трипанового синего.

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета Statistica 7.0. Для проверки нормальности распределения использовали критерий Шапиро-Уилка. В случае распределения, приближённого к нормальному, использовали t-критерий Стьюдента, в остальных случаях – критерий Манна-Уитни для оценки значимости различий. За пороговый уровень значимости принимали величину $p < 0,05$. Результаты представлены в виде среднего и его ошибки ($M \pm m$).

Результаты исследования

Выявлено статистически значимое уменьшение общего числа клеток после их инкубации с путресцином ($p < 0,05$), что коррелирует с увеличением его концентрации в пробе ($r = -0,75$; рис. 1). При культивировании с возрастающими концентрациями путресцина (50, 75, 100 ммоль/л) отмечена тенденция снижения числа жизнеспособных клеток. Число нежизнеспособных клеток статистически значимо не отличалось от аналогичного показателя в контрольных пробах.

При инкубации лейкоцитов с кадаверином выявлен обратный эффект этого метаболита на общее число лейкоцитов. Так, в пробах с концентрациями кадаверина 5 и 25 ммоль/л общее число клеток увеличилось до 3014 ± 1312 и 4000 ± 1292 в 1 мкл соответственно, против 1990 ± 1036 в 1 мкл в контрольных пробах ($p < 0,05$; рис. 1). Однако в пробах с большим содержанием кадаверина повышения общего количества лейкоцитов не зарегистрировано. Аналогичный эффект характерен для числа жизнеспособных лейкоцитов, когда наблюдается увеличение этого показателя в пробах с кадаверином в концентрациях 5 и 25 ммоль/л, а при более высоком содержании этого полиамина их количество сопоставимо с таковым в контрольных пробах. Кроме этого, отмечена тенденция к снижению числа нежиз-

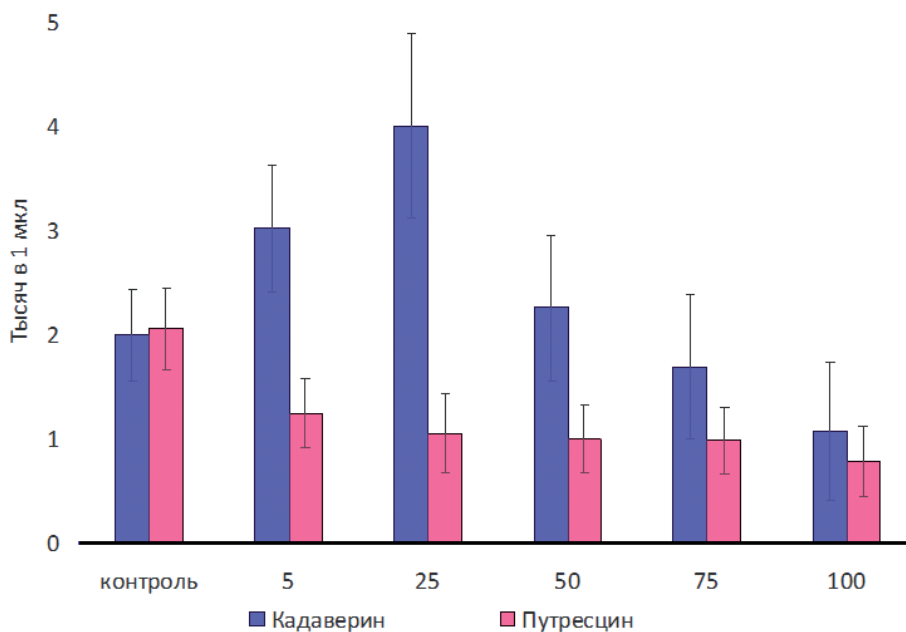


Рис. 1. Изменение общего числа клеток после инкубации с путресцином и кадаверином

Примечание: по оси абсцисс – концентрация полиаминов, ммоль/л; в контрольные пробы полиамины не вносили; по оси ординат – число клеток, тыс. в 1 мкл; значения указаны в виде $M \pm m$.

неспособных клеток до 28 ± 12 при 25 ммоль/л и 80 ± 47 в 1 мкл при 5 ммоль/л (425 ± 169 в 1 мкл в контрольных образцах; $p < 0,05$).

Обсуждение

Уменьшение общего количества лейкоцитов при увеличении концентрации путресцина можно было бы трактовать как цитотоксическое действие, однако при этом не возрастает число нежизнеспособных клеток. Отчасти такой эффект обусловлен тем, что лейкоциты способны метаболизировать путресцин через образование спермина и спермидина до перекиси водорода, аммония и акролеина, которые проявляют токсические свойства [8, 9], но, с другой стороны, наблюдается воздействие этого поликатиона на транскрипцию ДНК, что поддерживает жизнеспособность клеток [10]. Можно предположить, что в такой ситуации наблюдается торможение процесса деления лейкоцитов.

В ранее проведенных исследованиях прослежено, что при пероральном применении кадаверина у крыс наблюдается увеличение гематокрита и числа тромбоцитов в периферической крови, при этом токсичность кадаверина оказалась наименьшей [11]. Кадаверин участвует в регуляции трансляции митохондриальных белков, что необходимо для элиминации поврежденных органелл и выживания клеток [12]. Однако катабо-

лизм полиаминов может приводить к снижению уровня внутриклеточного ацетил-коэнзима А и накоплению токсичных продуктов [12, 13, 14].

В целом при размножении в очаге воспаления микроорганизмов-продуцентов можно ожидать, что при минимальной продукции полиаминов лейкоциты сохраняют жизнеспособность, но, как показано ранее, выживают и бактерии, подавляющие антимикробные факторы иммунитета [7, 15]. При прогрессировании воспаления наблюдается накопление путресцина и кадаверина и, соответственно, снижение выживаемости лейкоцитов. Такая ситуация отчасти может способствовать хронизации воспалительного процесса и нивелированию клинической картины [16]. Установлено, что продукты деградации путресцина ингибируют синтез провоспалительных цитокинов [17], а также адгезию и миграцию лейкоцитов [18]. Кроме этого, собственный хелатирующий эффект полиаминов оказывает противовоспалительное действие [19].

Заключение

Таким образом, путресцин и кадаверин оказывают разнонаправленное влияние на жизнеспособность лейкоцитов человека. Если путресцин во всех исследованных концентрациях приводит к уменьшению числа лейкоцитов, то при минимальных концентрациях кадаверина на-

блюдается увеличение количества лейкоцитов и в первую очередь за счёт жизнеспособных, а при увеличении концентрации этого поликатиона до 50 ммоль/л и выше число лейкоцитов оста-

ётся сопоставимым с контрольными пробами. Подобные изменения, вероятно, могут играть определённую роль в патогенезе воспалительных заболеваний бактериальной этиологии.

Литература

1. Бухарин О.В. Адаптивные стратегии взаимодействия возбудителя и хозяина при инфекции. Вестник Российской академии наук. 2018; 88(7): 637-643. <https://doi.org/10.31857/S086958730000087-3>
2. Brown S.P., Cornforth D.M., Mideo N. Evolution of virulence in opportunistic pathogens: generalism, plasticity, and control. *Trends Microbiol.* 2012; 20(7): 336-342. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2012.04.005>
3. Shah P., Swiatlo E. A multifaceted role for polyamines in bacterial pathogenesis. *Mol. Microbiol.* 2008; 68(1): 4-16. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06126.x>
4. Tabor C.W., Tabor H. Polyamines in microorganisms. *Microbiol. Rev.* 1985; 49(1): 81-99. <https://doi.org/10.1128/mr.49.1.81-99.1985>
5. Годовалов А.П., Карпунина Т.И., Нестерова Л.Ю. и др. Полиамины как рецептор-независимые факторы агрессии условно-патогенных микроорганизмов. Иммунопатология, аллергология, инфектология. 2019; 3: 91-94. <https://doi.org/10.14427/jipai.2019.3.91>
6. Нестерова Л.Ю., Негорелова Е.В., Ткаченко А.Г. Биогенные полиамины как модуляторы активности Quorum sensing системы и биопленкообразования *Vibrio harveyi*. Вестник Пермского университета. Серия "Биология". 2019; 3: 300-308. <https://doi.org/10.17072/1994-9952-2019-3-300-308>
7. Lohinai Z., Keremi B., Szoko E. et al. Bacterial lysine decarboxylase influences human dental biofilm lysine content, biofilm accumulation, and subclinical gingival inflammation. *J. Periodontol.* 2012; 83(8): 1048-1056. <https://doi.org/10.1902/jop.2011.110474>
8. Equi A.M., Brown A.M., Cooper A. et al. Oxidation of putrescine and cadaverine derivatives by diamine oxidases. *Tetrahedron.* 1991; 47(3): 507-518. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)90506-X](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)90506-X)
9. Hoet P.H., Nemery B. Polyamines in the lung: polyamine uptake and polyamine-linked pathological or toxicological conditions. *Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.* 2000; 278(3): L417-33. <https://doi.org/10.1152/ajplung.2000.278.3.L417>
10. Page A.F., Cseke L.J., Minocha R. et al. Genetic manipulation of putrescine biosynthesis reprograms the cellular transcriptome and the metabolome. *BMC Plant Biol.* 2016; 16(1): 113. <https://doi.org/10.1186/s12870-016-0796-2>
11. Til H.P., Falke H.E., Prinsen M.K., et al. Acute and subacute toxicity of tyramine, spermidine, spermine, putrescine and cadaverine in rats. *Food Chem Toxicol.* 1997; 35(3-4): 337-348. [https://doi.org/10.1016/s0278-6915\(97\)00121-x](https://doi.org/10.1016/s0278-6915(97)00121-x)
12. Bekebrede A.F., Keijer J., Gerrits W.J.J., et al. The Molecular and Physiological Effects of Protein-Derived Polyamines in the Intestine. *Nutrients.* 2020; 12(1): 197. <https://doi.org/10.3390/nu12010197>
13. Matthews H.R. Polyamines, chromatin structure and transcription. *Bioessays.* 1993; 15(8): 561-566. <https://doi.org/10.1002/bies.950150811>
14. Murray S.T., Dunston T.T., Woster P.M., et al. Polyamine catabolism and oxidative damage. *J. Biol. Chem.* 2018; 293: 18736-18745. <https://doi.org/10.1074/jbc.TM118.003337>
15. Морозов И.А., Карпунина Т.И., Годовалов А.П. Кадаверин как регулятор активности про- и эукариотических клеток. Аллергология и иммунология. 2018; 19(3): 149-150.
16. Hesterberg R.S., Cleveland J.L., Epling-Burnette P.K. Role of polyamines in immune cell functions. *Med. Sci. (Basel).* 2018; 6(1): 22. <https://doi.org/10.3390/medsci6010022>
17. Eisenberg T., Abdellatif M., Schroeder S. et al. Cardioprotection and lifespan extension by the natural polyamine spermidine. *Nat. Med.* 2016; 22: 1428-1438. <https://doi.org/10.1038/nm.4222>
18. Soda K., Kano Y., Nakamura T. et al. Spermine, a natural polyamine, suppresses LFA-1 expression on human lymphocyte. *J. Immunol.* 2005; 175: 237-245. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.1.237>
19. Lescoat G., Goufer L., Cannie I. et al. Involvement of polyamines in iron(III) transport in human intestinal Caco-2 cell lines. *Mol. Cell. Biochem.* 2013; 378: 205-215. <https://doi.org/10.1007/s11010-013-1611-0>

Сведения об авторах

Морозов Илья Андреевич – соискатель, Пермский государственный медицинский университет им. акад. Е.А. Вагнера. Россия, 614990, Пермь, ул. Петропавловская, д. 26; ORCID: 0000-0003-4233-3711. E-mail: Lonny8@yandex.ru.

Годовалов Анатолий Петрович – кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник ЦНИЛ, Пермский государственный медицинский университет им. акад. Е.А. Вагнера. ORCID: 0000-0002-5112-2003. E-mail: AGodovalov@gmail.com.

Карпунина Тамара Исаковна – доктор биологических наук, профессор кафедры микробиологии и вирусологии, Пермский государственный медицинский университет им. акад. Е.А. Вагнера. ORCID: 0000-0003-2511-4656. E-mail: karpuninapsma@mail.ru.

Поступила 12.12.2022 г.