

Полиамины как рецептор-независимые факторы агрессии условно-патогенных микроорганизмов

А.П. Годовалов¹, Т.И. Карпунина¹, Л.Ю. Нестерова², И.А. Морозов¹

¹ ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет им. акад. Е.А. Вагнера» Минздрава России, г. Пермь

² Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН – филиал ПФИЦ УрО РАН, г. Пермь

Polyamines as receptor-independent aggression factors of opportunistic pathogens

A.P. Godovalov¹, T.I. Karpunina¹, L.Yu. Nesterova², I.A. Morozov¹

¹ Acad. E.A. Wagner Perm State Medical University, Perm

² Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms of the Ural Branch RAS, Perm

Аннотация

При исследовании биогенных полиаминов много внимания уделяется их активности в прокариотических и трансформированных эукариотических клетках. Практически нет сведений о роли поликатионов микробного происхождения в развитии иммунного ответа.

Цель исследования – изучение влияния кадаверина и путресцина на жизнеспособность и функциональную активность лейкоцитов периферической крови здоровых доноров.

Материалы и методы. Оценивали жизнеспособность, фагоцитарную активность и способность к продукции радикалов у лейкоцитов периферической крови (n=10) после их прединкубации с кадаверином (0,01 M) и путресцином (0,01 M) в течение 60 минут при 37°C.

Результаты. Показано, что биогенные полиамины не оказывают влияния на жизнеспособность лейкоцитов, но при этом подавляют их фагоцитарную активность и способность к продукции кислородных радикалов, особенно нейтрофильных гранулоцитов. В то же время кадаверин увеличивает поглотительную активность как нейтрофилов, так и моноцитов.

Заключение. Способность кадаверина и путресцина подавлять функциональную активность лейкоцитов при сохранении их жизнеспособности можно рассматривать как фактор агрессии, особенно в контексте микробной персистенции.

Ключевые слова

Полиамины, микробная агрессия, фагоцитоз, радикалы, лейкоциты.

Summary

In the studies of biogenic polyamines, much attention is paid to their activity in prokaryotic and transformed eukaryotic cells. There is practically no information on the role of polycations of microbial origin in the development of an immune response to opportunistic pathogens.

The aim of research was to study the effect of cadaverine and putrescine on the viability and functional activity of peripheral blood leukocytes from healthy donors.

Materials and methods. Viability, phagocytic activity and the ability to produce radicals by peripheral blood leukocytes (n=10) after their preincubation with cadaverine (0.01 M) and putrescine (0.01 M) for 60 minutes at 37°C were evaluated.

Results. It was shown that biogenic polyamines do not affect the viability of leukocytes, but at the same time inhibit their phagocytic activity and the ability to produce oxygen radicals, especially by neutrophilic granulocytes. Cadaverin increases the absorption activity of both neutrophils and monocytes. *Conclusion.* Thus, the ability of cadaverine and putrescine to suppress the functional activity of leukocytes while maintaining their viability can be considered as a factor of aggression, especially in the context of microbial persistence.

Keywords

Polyamines, microbial aggression, phagocytosis, radicals, white blood cells.

Введение

В настоящее время известно, что функционирование подсистемы врожденного иммунитета базируется на идентификации паттерн-распознающими рецепторами структур, имеющих сходное строение у группы микроорганизмов. Так, например, липополисахарид грамотрицательных микроорганизмов является лигандом для Toll-подобного рецептора (TLR) 4 макрофагов и других фагоцитирующих клеток. В последующем их взаимодействие приводит к активации клеток и развертыванию иммунного ответа [1]. Однако, такая ситуация для микроорганизмов неблагоприятна, поскольку приводит к их элиминации из организма-хозяина и не обеспечивает сохранение вида. В силу этого микробы выработали целый комплекс факторов противодействия иммунной системе человека. Так, например, *Mycobacterium tuberculosis* обладает способностью откладывать на своей поверхности С3b-компонент комплемента, что усиливает фагоцитоз микобактерий [2], а в дальнейшем особое строение клеточной стенки и ряд секретируемых факторов тормозят функциональную активность макрофагов, что обеспечивает выживание патогена [3].

Стратегия жизнедеятельности условно патогенных микроорганизмов (УПМ) несколько отличается от таковой у патогенов, когда даже при успешном распознавании клетками врожденного иммунитета ответная реакция не столь выражена. Только в этом случае УПМ получают возможность колонизировать биотопы, успешно жить в них, накапливать биомассу и таким образом обеспечивать сохранение вида. Формирование симбиоза зависит от наличия целого спектра как факторов патогенности УПМ, так и секретируемых метаболитов, продукция которых зависит от условий окружающей среды [4]. Особый интерес исследователей привлекают соединения, действующие без участия специфических рецепторов, как, например, биогенные полиамины.

В большинстве научных исследований показано, что кадаверин и путресцин относятся к диаминам, которые способны образовывать микроорганизмы при декарбоксилировании лизина и орнитина [5]. Такая ситуация наблюдается, например, в очаге воспаления, где синтез этих поликатионов бактериями, как правило, усиливается [6]. В этой связи представляют интерес особенности функционирования эукариотических клеток в присутствии полиаминов бактериального происхождения.

Цель исследования – изучение влияния кадаверина и путресцина на жизнеспособность и

функциональную активность лейкоцитов периферической крови здоровых доноров.

Материалы и методы

Пробы периферической венозной крови были получены от 10 практически здоровых доноров. Оценивали фагоцитарную активность лейкоцитов по методу Shilov et al. [7] после прединкубации клеток с кадаверином (0,01 М) и путресцином (0,01 М) в течение 60 минут при 37°C. Постановку фагоцитарного теста проводили с формализированными эритроцитами барана. Подготовленные препараты после фиксации окрашивали по методу Романовского-Гимза и микроскопировали при инструментальном увеличении объектива $\times 100$. Подсчитывали число фагоцитирующих клеток дифференцировано – нейтрофилы/моноциты – и по количеству поглощенных объектов.

Для оценки продукции кислородных радикалов проводили реакцию люминолзависимой хемилюминесценции (ЛЗХЛ) с лейкоцитами крови [8], выделенными методом седиментации с 0,1% метилцеллюлозой (Sigma-Aldrich, США), с последующей прединкубацией с кадаверином (0,01 М) и путресцином (0,01 М) в течение 60 минут при 37°C. При постановке реакции ЛЗХЛ в лунках планшета смешивали 70 мкл раствора Хенкса без фенолового красного, 10 мкл натриевой соли люминола (Sigma, США) на растворе Хенкса (конечная концентрация 2×10^{-4} М), 10 мкл клеток (25×10^6 /мл) и 10 мкл неопсонизированного зимозана (конечные концентрации 15, 150 и 1500 мкг/мл). Измерение проводили на люминиметре Luminoskan Ascent® Thermo Labsystems в течение 180 мин. Для статистического анализа использовали интегральный показатель хемилюминесценции за весь период измерения (RLU).

До и после прединкубации лейкоцитов с полиаминами оценивали число жизнеспособных клеток с помощью витального красителя – 0,1% раствора трипанового синего.

Статистическую обработку результатов осуществляли с помощью парного варианта t-критерия Стьюдента. За пороговый уровень значимости принимали величину $p < 0,05$.

Результаты исследований

Показано, что кадаверин и путресцин не оказывают существенного влияния на жизнеспособность лейкоцитов периферической крови человека. Число жизнеспособных клеток после экспозиции с поликатионами не изменялось и составляло в среднем 95%.

Вместе с тем, под влиянием полиаминов менялась функциональная активность клеток. В пробах с кадаверином установлено снижение фагоцитарной активности лейкоцитов периферической крови человека, а также изменение соотношения фагоцитирующих клеток. В первую очередь уменьшалось число фагоцитирующих нейтрофилов (до 42%, против 65% в контроле), очевидно, за счет тех из них, которые проявляли слабую активность, поскольку статистически значимо увеличивалась доля клеток, захвативших более 2 объектов (рис. 1). Поскольку наблюдалось уменьшение числа фагоцитирующих нейтрофилов, компенсаторно происходило увеличение количества фагоцитирующих моноцитарных лейкоцитов (рис. 2А). В то же время под влиянием кадаверина у моноцитов увеличивалась поглотительная активность (рис. 2Б).

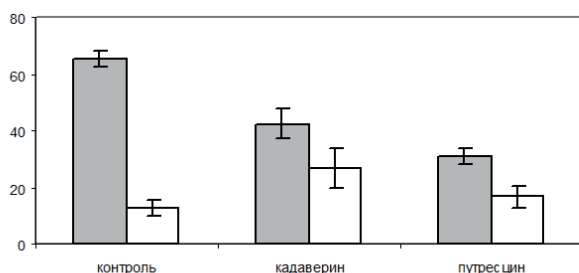
Установлено, что путресцин преимущественно оказывал влияние на количество фагоцитирующих нейтрофильных лейкоцитов (рис. 1А), не изменяя численность фагоцитирующих моно-

цитов (рис. 2А). При этом поглотительная активность нейтрофилов и моноцитов существенно не отличалась от аналогичного показателя в контрольных пробах (рис. 1Б, 2Б).

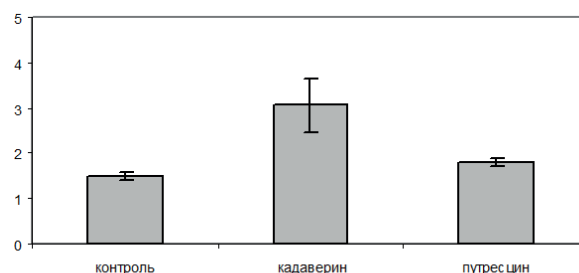
При оценке радикал-продуцирующей функции лейкоцитов, показано, что полиамины статистически значимо снижали люминолзависимую хемилюминесценцию клеток в зимозан-стимулированных пробах до уровня контрольных проб, содержащих интактные клетки. Для кадаверина установлена стимуляция продукции радикалов, сопоставимая с действием субоптимальной дозы зимозана, но исключительно в первые часы реакции (ЛЗХЛ).

Обсуждение

Как известно, для микроорганизмов важна антистрессорная функция биогенных полиаминов, поскольку, колонизируя новые места и биотопы, микробные клетки сталкиваются с неблагоприятными факторами окружающей среды. Предполагается, что эти поликатионы могут оказывать

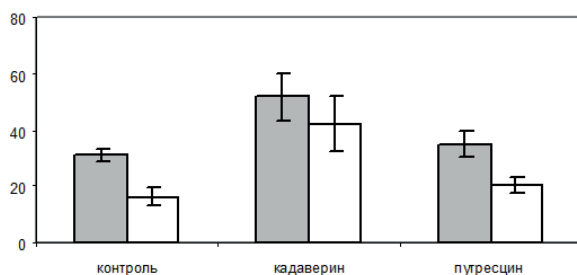


А

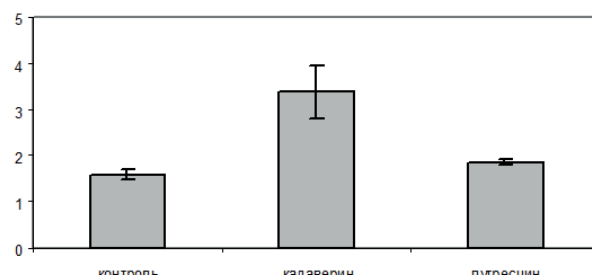


Б

Рис. 1. Влияние полиаминов на фагоцитарную активность нейтрофильных гранулоцитов. На рисунке А серый столбик – число фагоцитирующих клеток (%), белый – число «активных» фагоцитов (%). На рисунке Б – число поглощенных нейтрофилами объектов (штуки).



А



Б

Рис. 2. Влияние полиаминов на фагоцитарную активность моноцитов. На рисунке А серый столбик – число фагоцитирующих клеток (%), белый – число «активных» фагоцитов (%). На рисунке Б – число поглощенных моноцитами объектов (штуки).

действие как за счет регуляции экспрессии генов, непосредственно участвующих в этих процессах, так и через их эффект на системы, осуществляющие межклеточную коммуникацию [9, 10]. Ранее установлено [9, 11], что синтез кадаверина клетками *E. coli* строго зависит от содержания кислорода, а его повышенное содержание в бактериальных клетках в условиях сниженной аэрации можно объяснить отсутствием необходимости осуществлять антиоксидантное действие. В очаге воспаления эффекторы защиты реализуют свои функции в значительной степени за счет продукции кислородных радикалов [12]. В этих условиях усиленная продукция диаминов может способствовать выживанию УПП благодаря антиоксидантному эффекту. В то же время, установленное нами супрессивное влияние кадаверина и путресцина на функциональную активность лейкоцитов, позволяет расценивать синтез этих метаболитов бактериями не только как защитную реакцию. Более того, если роль полиаминов, как регуляторов внутри бактериальных функций, можно считать доказанной [11], то прослеженные в настоящем исследовании эффекты позволяют предполагать и другие внеклеточные мишени

для этих поликатионов. В первую очередь, подавление функций лейкоцитов указывает на то, что полиаминам присуще антагонистическое действие. Продуцируя путресцин и кадаверин, микроорганизмы способны выдерживать атаку лейкоцитов человека и, возможно, выживать в их фагосомах. Образуя эти метаболиты, бактерии обуславливают своеобразную супрессию иммунных клеток, создавая предпосылки для длительной персистенции.

Заключение

Таким образом, кадаверин и путресцин, продукция которых осуществляется микроорганизмами в зависимости от условий микроокружения, можно отнести к дополнительным рецептор-независимым факторам микробной агрессии, поскольку они обладают негативным модулирующим действием на фагоцитирующие клетки, что может способствовать бактериальной персистенции.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Администрации Пермского края в рамках научного проекта 17-44-590404 p_a.

Литература

1. Janeway C.A. Jr., Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol.* 2002; 20(0):197-216.
2. Ferguson J.S., Weis J.J., Martin J.L., Schlesinger L.S. Complement protein C3 binding to mycobacterium tuberculosis is initiated by the classical pathway in human bronchoalveolar lavage fluid. *Infect Immun.* 2004; 72(5): 2564–2573.
3. Uribe-Querol E., Rosales C. Control of phagocytosis by microbial pathogens. *Front Immunol.* 2017; 8: 1368.
4. 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.
5. Tabor C.W., Tabor H. Polyamines in microorganisms. *Microbiol Rev.* 1985; 49(1): 81–99.
6. Hesterberg R.S., Cleveland J.L., Epling-Burnette P.K. Role of polyamines in immune cell functions. *Med Sci (Basel)* 2018; 6(1): 22.
7. Shilov J.I., Orlova E.G. Role of adrenergic mechanisms in regulation of phagocytic cell functions in acute stress response. *Immunology Letters* 2003; 86: 229-233.
8. Годовалов А.П., Шилов Ю.И., Вавилов Н.В., Карпунина Т.И. Люминолзависимая хемилюминесценция как средство выявления маркеров окислительного стресса. Материалы III Международной научной конференции «Высокие технологии, определяющие качество жизни» 2018; 201-203.
9. Нестерова Л.Ю., Негорелова Е.В., Ткаченко А.Г. Биогенные полиамины как модуляторы активности Quorum sensing системы и биопленкообразования *Vibrio harveyi*. Вестник Пермского университета. Сер. Биология 2019; 3: 300-308.
10. Igarashi K., Kashiwagi K. Characterization of genes for polyamine modulon. *Methods in Molecular Biology* 2011; 720: 51-65.
11. Ткаченко А.Г. Стрессорные ответы бактериальных клеток как механизм развития толерантности к антибиотикам. Прикладная биохимия и микробиология 2018; 54(2): 110-133.
12. Teng T.-S., Ji A., Ji X.-Y., Li Y.-Z. Neutrophils and immunity: from bactericidal action to being conquered. *J Immunol Res.* 2017; 2017: 9671604.

Сведения об авторах:

Годовалов Анатолий Петрович – канд. мед. наук, ведущий научный сотрудник ЦНИЛ, доцент кафедры микробиологии и вирусологии ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет им. акад. Е.А. Вагнера» Минздрава России (614990, г. Пермь, ул. Петропавловская, д. 26) AGodovalov@gmail.com (Автор для корреспонденции)

Карпунина Тамара Исаковна – д-р. биол. наук, профессор кафедры микробиологии и вирусологии ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет им. акад. Е.А. Вагнера» Минздрава России (614990, г. Пермь, ул. Петропавловская, д. 26)

Нестерова Лариса Юрьевна – канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории адаптации микроорганизмов филиала ПФИЦ УрО РАН «Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» (614990, г. Пермь, ул. Голева, д. 13)

Морозов Илья Андреевич – студент лечебного факультета ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет им. акад. Е.А. Вагнера» Минздрава России (614990, г. Пермь, ул. Петропавловская, д. 26)

Статья участвует в конкурсе публикаций 2019 г. в категории "Инфектология". Страница голосования: <https://vk.com/immunopathology>