

БИОЛОГИЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МЕДИЦИНА

Научная статья

УДК 547.415.5

DOI: 10.17816/pmj414168-174

ДОЗОЗАВИСИМОЕ ВЛИЯНИЕ КАДАВЕРИНА НА ПРОДУКЦИЮ ГИДРОКСИЛЬНЫХ РАДИКАЛОВ ЛЕЙКОЦИТАМИ ЧЕЛОВЕКА

И.А. Морозов

*Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера,
Российская Федерация*

DOSE-DEPENDENT EFFECT OF CADAVERINE ON HYDROXYL RADICALS' PRODUCTION BY HUMAN PERIPHERAL BLOOD LEUKOCYTES

I.A. Morozov

E.A. Vagner Perm State Medical University, Russian Federation

Цель. Оценить изменение генерации гидроксильных радикалов лейкоцитами под влиянием кадаверина в концентрациях 1; 5 и 25 ммоль/л.

В настоящее время наблюдается активное изучение роли полиаминов, синтезируемых микроорганизмами в очаге воспаления. Эти соединения обладают способностью влиять на функциональную активность эукариотических клеток без участия специфических рецепторов. Среди полиаминов бактериального происхождения интерес представляет кадаверин, который относится к алифатическим диаминам. Учитывая функцию «скавенджера» свободных радикалов, которую проявляет кадаверин, представляет интерес изучение дозозависимого эффекта этого полиамина на генерацию радикалов лейкоцитами человека.

Материалы и методы. Пробы периферической венозной крови были получены от 40 практически здоровых доноров. Для оценки продукции гидроксильных радикалов проводили реакцию люминолзависимой хемилюминесценции с лейкоцитами крови, которые предварительно инкубировали с кадаверинном в концентрациях 1; 5 и 25 ммоль/л. Исследование проводили на люминометре Luminoskan Ascent® Thermo Labsystems (США) в течение 180 мин. Для статистического анализа использовали ин-

© Морозов И.А., 2024

тел. +7 999 574 82 28

e-mail: Lonny8@yandex.ru

[Морозов И.А. – аспирант кафедры микробиологии и вирусологии, ORCID: 0000-0003-4233-3711].

© Morozov I.A., 2024

tel. +7 999 574 82 28

e-mail: Lonny8@yandex.ru

[Morozov I.A. (*contact person) – Postgraduate Student of the Department of Microbiology and Virology, ORCID: 0000-0003-4233-3711].

тегральный показатель хемилюминесценции за весь период измерения (RLU). Рассчитывали время достижения максимума световспышек в минутах, интенсивность максимального свечения, а также площадь под кривой гашения люминесценции.

Результаты. Установлено, что предварительная инкубация клеток с кадаверином существенно сокращает их время выхода на максимум генерации гидроксильных радикалов. Кроме этого кадаверин усиливает интенсивность реакции люминолзависимой хемилюминесценции лейкоцитов здоровых доноров, а наибольший стимулирующий эффект зарегистрирован для концентрации полиамина 5 ммоль/л ($p = 0,009$ к пробам со спонтанной реакцией, $p = 0,007$ и $0,010$ к пробам с кадаверином 1 ммоль/л и 25 ммоль/л соответственно). Кадаверин увеличивает площадь под кривой реакции люминолзависимой хемилюминесценции, причем в концентрации 5 ммоль/л наиболее существенно – $20,89 \pm 3,00$ против $0,86 \pm 0,07$ усл. ед. при спонтанной реакции ($p = 0,001$).

Выводы. Результаты исследования указывают на возможное влияние кадаверина на механизмы образования гидроксильных радикалов, а также активность фермента диаминооксидазы в лейкоцитах. Можно предположить, что совокупность этих эффектов способствует созданию благоприятной среды для микроорганизмов в очаге воспаления. Таким образом, микроорганизмы, продуцирующие кадаверин, модулирующий генерацию гидроксильного радикала лейкоцитами, адаптируются к среде обитания, создавая особый тип микроокружения, который, вероятно, влияет в малосимптомное течение воспалительного процесса.

Ключевые слова. Полиамины, кадаверин, лейкоциты, гидроксильные радикалы, хемилюминесценция, микроорганизмы.

Objective. To assess changes in the generation of hydroxyl radicals by leukocytes under the influence of cadaverine at concentrations of 1, 5 and 25 mmol/L.

Materials and methods. Peripheral venous blood samples were obtained from 40 apparently healthy donors. To assess the production of hydroxyl radicals, a luminol-dependent chemiluminescence reaction with blood leukocytes, which were pre-incubated with cadaverine at concentrations of 1, 5 and 25 mmol/L was carried out. The study was conducted on a Luminoskan Ascent® Thermo Labsystems (USA) luminometer for 180 minutes. For statistical analysis, the integral chemiluminescence indicator for the entire measurement period (RLU) was used. The time to reach the maximum of light flashes in minutes, the intensity of the utmost glow, and the area under the luminescence extinction curve were calculated.

Results. It was determined that pre-incubation of cells with cadaverine significantly reduces their time to reach the maximum generation of hydroxyl radicals. In addition, cadaverine enhances the intensity of the reaction of luminol-dependent chemiluminescence of leukocytes of healthy donors, and the greatest stimulating effect was recorded at a polyamine concentration of 5 mmol/L ($p = 0,009$ to samples with a spontaneous reaction, $p = 0,007$ and $0,010$ to samples with cadaverine 1 mmol/L and 5 mmol/L respectively). Cadaverine increases the area under the reaction curve, it being the most significant at a concentration of 5 mmol/L – 20.89 ± 3.00 c.u. versus 0.86 ± 0.07 c.u. with a spontaneous reaction ($p = 0,001$).

Conclusions. The results of the study indicate a possible effect of cadaverine on the mechanisms of hydroxyl radical formation, as well as the activity of the diamine oxidase enzyme in leukocytes. It can be supposed that the combination of these effects contributes to the development of the environment favorable for microorganisms at the focus of inflammation. Thus, microorganisms that produce cadaverine, which modulates the generation of hydroxyl radicals by leukocytes, adapt to their environment, creating a special type of microenvironment, which probably results in an asymptomatic course of the inflammatory process.

Keywords. Polyamines, cadaverine, leukocytes, hydroxyl radicals, chemiluminescence, microorganisms.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время наблюдается интерес к роли полиаминов в межклеточных коммуникациях, особенно в контексте мик-

робных сообществ и развития воспаления [1], что обусловлено накоплением этих соединений в очаге воспаления, а также их уникальной способностью влиять на клеточные процессы эукариотических клеток без

участия специфических рецепторов [2; 3]. Известно, что такие полиамины, как кадаверин и путресцин, воздействуют на экспрессию генов, активируют сигнальные каскады и модулируют интерклеточные сигналы, что делает их значимыми объектами для исследований [4–6]. Считается, что основными точками приложения полиаминов являются проникновение внутрь клетки через вторично-активный транспорт, изменение белковых молекул, связь с молекулами ДНК и РНК [5; 7]. Привлекает внимание среди семейства полиаминов кадаверин, который по своей химической структуре относится к алифатическим диаминам [6]. Показано, что различные факторы, включая недостаток питательных веществ, воздействие антимикробных и других веществ, присутствующих в очаге воспаления в значительном количестве, активируют синтез кадаверина некоторыми микроорганизмами (*Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium*, *Vibrio cholerae* и др.) [8–10].

Как известно, образование активных форм кислорода лейкоцитами, таких как пероксид водорода, супероксидный анион-радикал, синглетный кислород, гидроксильный радикал и гипохлорид, является ключевым фактором в процессе деструкции поглощенных объектов [11; 12]. Нарушение этого процесса приводит к незавершенности фагоцитоза и способствует в целом неэффективности всего клеточного звена иммунного ответа [13]. Ранее при исследовании полиаминов было выявлено стимулирующее действие кадаверина на радикалпродуцирующую активность лейкоцитов [4; 14]. При этом фермент лейкоцитов диаминооксидаза выполняет антимедиаторные противовоспалительные функции путем инактивации гистамина и других диаминов, включая кадаверин и путресцин [19]. Это может создавать благоприятную среду для микроорганизмов, поскольку их структуры могут быть защищены избытком полиаминов, которые, в свою

очередь, стимулируют антимедиаторную активность диаминооксидазы [20; 21]. В результате этого наблюдается снижение активности воспаления [7; 22], что также подтверждается исследованиями *in vivo* [23; 24].

В настоящее время представляет интерес изучение дозозависимого эффекта этого полиамина.

Цель исследования – оценить изменение генерации гидроксильных радикалов лейкоцитами под влиянием кадаверина в концентрациях 1; 5 и 25 ммоль/л.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Пробы периферической венозной крови были получены от 40 практически здоровых доноров. Для оценки продукции гидроксильных радикалов проводили реакцию люминолзависимой хемилюминесценции (ЛЗХЛ) с лейкоцитами крови [15], выделенными методом седиментации с 0,1%-ной метилцеллюлозой (США), с последующей инкубацией с кадаверином в концентрациях 1; 5 и 25 ммоль/л в течение 60 мин при 37 °С. При постановке реакции ЛЗХЛ использовали $2 \cdot 10^{-4}$ М натриевой соли люминола (Sigma, США), предобработанные кадаверином клетки ($25 \cdot 10^6$ /мл). Измерение проводили на люминометре Luminoskan Ascent® Thermo Labsystems (США) в течение 180 мин. Для статистического анализа использовали интегральный показатель хемилюминесценции за весь период измерения (RLU). Рассчитывали время достижения максимума световспышек в минутах, интенсивность максимального свечения, а также площадь под кривой гашения люминесценции.

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета Statistica 7.0. Для проверки нормальности распределения применяли критерий Шапиро – Уилка. В случае распределения, приближенного к нор-

мальному, 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 И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Установлено, что инкубация клеток с кадаверином существенно сокращает их время выхода на максимум генерации гидроксильных радикалов (рис. 1), которое составило $19,3 \pm 0,8$ мин при концентрации кадаверина 1 ммоль/л ($p = 0,009$ к пробам со спонтанной реакцией); $32,3 \pm 4,8$ и $19,0 \pm 0,8$ мин при 5 и 25 ммоль/л соответственно ($p = 0,09$ и $0,02$ к пробам со спонтанной реакцией).

Максимальный интегральный показатель хемилюминесценции за весь период измерения при концентрации кадаверина 1 ммоль/л составил $0,081 \pm 0,004$ RLU, при 5 ммоль/л – $0,130 \pm 0,013$ RLU, при 25 ммоль/л – $0,083 \pm 0,022$ RLU ($p = 0,008$; $0,009$ и $0,004$ к пробам со спонтанной реакцией). Как видно из рис. 2, кадаверин статистически значимо усиливает интенсивность реакции ЛЗХЛ лейкоцитов здоровых доноров, при этом наибольший стимулирующий эффект зарегистрирован для концентрации полиамина 5 ммоль/л ($p = 0,009$ к пробам со спонтанной реакцией, $p = 0,007$ и $0,010$ к пробам с кадаверином 1 и 25 ммоль/л соответственно).

Аналогичный эффект выявлен и при расчете площади под кривой реакции ЛЗХЛ (рис. 3). Кадаверин увеличивает этот показатель, причем в концентрации 5 ммоль/л наиболее существенно – $20,89 \pm 3,00$ против $0,86 \pm 0,07$ усл. ед. при спонтанной реакции ($p = 0,001$).

Известно, что синтез бактериями полиаминов в очаге воспаления повышается. При этом постепенное накопление кадаверина, вероятно, оказывает стимулирующее влияние

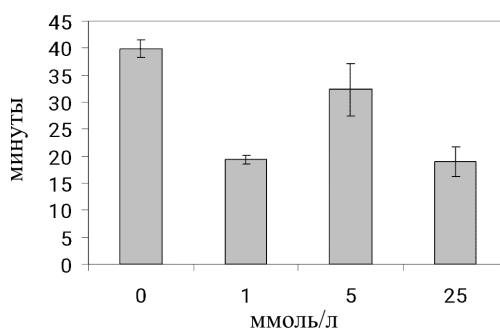


Рис. 1. Время выхода реакции ЛЗХЛ на максимум при инкубации клеток с кадаверином, мин

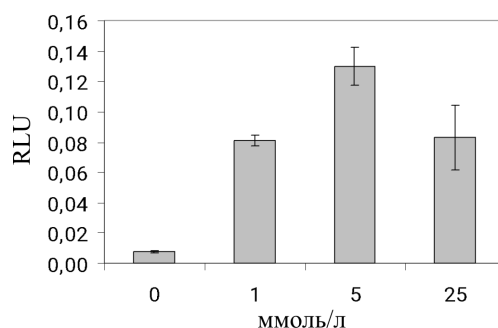


Рис. 2. Максимальная интенсивность реакции ЛЗХЛ при инкубации лейкоцитов с кадаверином, RLU

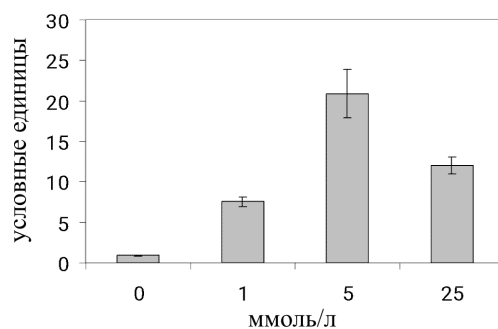


Рис. 3. Площадь под кривой реакции ЛЗХЛ при инкубации лейкоцитов с кадаверином, усл. ед.

на генерацию радикалов лейкоцитами, что проявляется увеличением скорости их продукции, об этом говорит ускорение времени выхода на пик, а также накопление активных форм, о чем свидетельствует увеличение площади под кривой. Однако при даль-

нейшем увеличении концентрации полиаминов кадаверин играет роль «скавенджера» радикалов, снижая их содержание, что выражается в уменьшении площади под кривой в реакции ЛЗХЛ.

Отмеченное в настоящем исследовании увеличение продукции радикалов, индуцированное предварительной обработкой кадаверином нейтрофилов и моноцитов, указывает на возможное влияние этого соединения на механизмы образования гидроксильных радикалов, а также активность диаминоксидазы в лейкоцитах [16]. Этот фермент катализирует превращение диаминов в аминокальдегид, что сопровождается высвобождением перекиси водорода с последующим взаимодействием с люминолом, присутствующим в реакционной смеси [13]. Стоит отметить, что активность диаминоксидазы возрастает практически мгновенно после инициации фагоцитарной активности [17; 18].

ВЫВОДЫ

1. Предварительная инкубация лейкоцитов с кадаверином увеличивает продукцию ими гидроксильных радикалов.

2. Показана зависимость продукции гидроксильных радикалов лейкоцитами от концентрации кадаверина. При этом более выраженное влияние оказывает средняя концентрация кадаверина.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК / REFERENCES

1. Годовалов А.П., Карпунина Т.И., Гушчин М.О. Особенности межмикробных отношений в микробиоте влагалища infertile women's vagina microbiota. *Medical academic journal* 2017; 17 (4): 53–54 (in Russian).
2. Lohinai Z., Keremi B., Szoko E., Tabi T., Szabo C., Tulassay Z., Levine M. Bacterial lysine decarboxylase influences human dental biofilm lysine content, biofilm accumulation, and subclinical gingival inflammation. *J. Periodontol.* 2012; 83 (8): 1048–1056. DOI: 10.1902/jop.2011.110474
3. Fujisawa S., Kadoma Y. Kinetic evaluation of polyamines as radical scavengers. *Anticancer Res.* 2005; 25 (2): 965–969.
4. Годовалов А.П., Карпунина Т.И., Нестерова Л.Ю., Морозов И.А. Полиамины как рецептор-независимые факторы агрессии условно-патогенных микроорганизмов. Иммунопатология, аллергология, инфектология 2019; 3: 91–94 / Godovalov A.P., Karpunina T.I., Nesterova L.Yu., Morozov I.A. Polyamines as receptor-independent factors of aggression of opportunistic microorganisms. *Immunopatologiya, allergologiya, infektologiya* 2019; 3: 91–94 (in Russian).
5. 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 / Nesterova L.Yu., Negorelova E.V., Tkachenko A.G. Biogenic polyamines as modulators of the activity of the Quorum sensing system and biofilm formation of *Vibrio harveyi*. *Bulletin of Perm University. Biology Series* 2019; 3: 300–308 (in Russian).
6. Igarashi K., Kasai H. Characterization of genes for polyamine modulon. *Methods Mol. Biol.* 2011; 720: 51–65. DOI: 10.1007/978-1-61779-034-8_3
7. Equi A.M., Brown A.M., Cooper A., Her S.K., Watson A.B., Robins D.J. Oxidation of putrescine and cadaverine derivatives by diamine oxidases. *Tetrahedron* 1991; 47 (3): 507–518.

8. Ткаченко А.Г. Стрессорные ответы бактериальных клеток как механизм развития толерантности к антибиотикам. Прикладная биохимия и микробиология 2018; 54 (2): 110–133 / Tkachenko A.G. Stress responses of bacterial cells as a mechanism for the development of tolerance to antibiotics. *Applied Biochemistry and Microbiology* 2018; 54 (2): 110–133 (in Russian).
9. Bigger J.W. Treatment of staphylococcal infections with penicillin by intermittent sterilization. *Lancet* 1944; 244 (6320): 497–500.
10. Shab P., Swiatlo E. A multifaceted role for polyamines in bacterial pathogens. *Mol. Microbiol.* 2008; 68 (1): 4–16. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2008.06126.x
11. Flannagan R.S., Jaumouillé V., Grinstein S. The cell biology of phagocytosis. *Annu. Rev. Pathol.* 2012; 7: 61–98. DOI: 10.1146/annurev-pathol-011811-132445
12. Janeway C.A. Jr., Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 2002; 20: 197–216.
13. 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. DOI: 10.1155/2017/9671604
14. 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 / Morozov I.A., Karpunina T.I., Godovalov A.P. Cadaverine as a regulator of the activity of pro- and eukaryotic cells. *Allergology and Immunology* 2018; 19: 149–150 (in Russian).
15. Tabor C.W., Tabor H. Polyamines in microorganisms. *Microbiol. Rev.* 1985; 49 (1): 81–99.
16. Mei Y., Ran L., Ying X., Yuan Z., Xin S. A sequential injection analysis/chemiluminescent plant tissue-based biosensor system for the determination of diamine. *Biosens Bioelectron.* 2007; 22 (6): 871–876. DOI: 10.1016/j.bios.2006.03.003
17. Houen G., Högdall E.V., Barkholt V., Nørskov L. Lactoferrin: similarity to diamine oxidase and purification by aminohexyl affinity chromatography. *Eur. J. Biochem.* 1996; 241 (1): 303–308.
18. 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. DOI: 10.1016/s0165-2478(03)00027-0
19. Hesterberg R.S., Cleveland J.L., Epling-Burnette P.K. Role of polyamines in immune cell functions. *Med. Sci. (Basel).* 2018; 6 (1): 22. DOI: 10.3390/medsci6010022
20. Бухарин О.В. Адаптивные стратегии взаимодействия возбудителя и хозяина при инфекции. Вестник Российской академии наук 2018; 88 (7): 637–643 / Bukharin O.V. Adaptive strategies for the interaction of the pathogen and the host during infection. *Bulletin of the Russian Academy of Sciences* 2018; 88 (7): 637–643 (in Russian).
21. Fisher R.A., Gollan B., Helaine S. Persistent bacterial infections and persister cells. *Nat. Rev. Microbiol.* 2017; 15 (8): 453–464. DOI: 10.1038/nrmicro.2017.42
22. Uribe-Querol E., Rosales C. Control of phagocytosis by microbial pathogens. *Front. Immunol.* 2017; 8: 1368. DOI: 10.3389/fimmu.2017.01368
23. Годовалов А.П., Даниелян Т.Ю., Карпунина Т.И., Вавилов Н.В. Опыт изучения микрофлоры и белков эякулята при разной эхоскопической картине предстательной железы. Инфекция и иммунитет 2019; 9 (2): 347–353 / Godovalov A.P., Danielyan T.Yu., Karpunina T.I., Vavilov N.V. Experience in studying the microflora and proteins of ejaculate with different echoscopic picture of the prostate gland. *Russian Journal of Infection and Immunity* 2019; 9 (2): 347–353 (in Russian).
24. Осипович О.А., Годовалов А.П. К вопросу о роли воспалительных заболеваний в развитии бесплодия у женщин. Медицинский альманах 2016; 5 (45): 85–87 / Osipovich O.A., Godovalov A.P. On the question of the role of inflammatory diseases in the development of infertility in women. *Medical Almanac* 2016; 5 (45): 85–87

vich O.A., Godovalov A.P. To the matter of role of inflammatory diseases in development of women's sterility. *Medical almanac* 2016; 5 (45): 85–87 (in Russian).

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Вклад автора 100 %.

Поступила: 08.04.2024

Одобрена: 27.05.2024

Принята к публикации: 21.06.2024

Просьба ссылаться на эту статью в русскоязычных источниках следующим образом: Морозов, И.А. Дозозависимое влияние кадаверина на продукцию гидроксильных радикалов лейкоцитами человека / И.А. Морозов // Пермский медицинский журнал. – 2024. – Т. 41, № 4. – С. 168–174. DOI: 10.17816/pmj414168-174

Please cite this article in English as: Morozov I.A. Dose-dependent effect of cadaverine on hydroxyl radicals' production by human peripheral blood leukocytes. *Perm Medical Journal*, 2024, vol. 41, no. 4, pp. 168-174. DOI: 10.17816/pmj414168-174