

Ю.В.Сизова, Р.В.Писанов, О.С.Бурлакова, И.Я.Черепяхина, В.В.Балахнова

## РОЛЬ КАДАВЕРИНА В АДАПТАЦИИ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ К СТРЕССУ, ОБУСЛОВЛЕННОМУ ГИПОКСИЕЙ

ФКУЗ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт», Ростов-на-Дону, Российская Федерация

**Цель.** Изучение роли кадаверина в адаптации холерных вибрионов к стрессу, обусловленному гипоксией. **Материалы и методы.** В работе использовано 18 штаммов *V.cholerae* с различным набором детерминант патогенности, выделенные от больных и из речной воды. **Результаты и выводы.** Показано, что при экспериментальном моделировании газовой среды кишечника, холерные вибрионы реагируют на неблагоприятные условия окружающей среды путем продукции кадаверина. При этом его количество коррелирует с патогенностью культур (оно выше у эпидемически значимых штаммов, чем у штаммов, лишенных генов токсина и пилепродукции). Установлено, что уровень продукции внеклеточного кадаверина выше, чем внутриклеточного, но соотношение этих показателей зависит от концентрации кислорода и углекислоты в окружающей среде. Внутриклеточный кадаверин образуется, в основном, при условии высокой концентрации кислорода (10–12 %), при выраженной гипоксии (<1 % O<sub>2</sub>) и повышении уровня углекислого газа (9–13 %) его количество резко снижается.

**Ключевые слова:** полиамины, кадаверин, холерный вибрион, персистенция, адаптация, гипоксия.

Корреспондирующий автор: Сизова Юлия Владимировна, e-mail: E-mail: plague@aaanet.ru.

Yu.V.Sizova, R.V.Pisanov, O.S.Burlakova, I.Ya.Cherepakhina, V.V.Balakhnova

## The Role of Cadaverine in Cholera Vibrio Adaptation to Stress Conditions, Induced by Hypoxia

Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute, Rostov-on-Don, Russian Federation

**Objective** of the study is to evaluate the role of cadaverine in cholera vibrio adaptation to stress, induced by hypoxia. **Materials and methods.** Utilized have been 18 *V. cholerae* strains with different set of pathogenicity determinants. The strains are isolated from patients and from river-water. **Results and conclusions.** It is demonstrated that under experimental modeling of intestinal tract gas medium, cholera vibrios respond to unfavorable conditions of the environment by producing cadaverine. Its amount coincides with pathogenicity of cultures (it is higher in epidemically significant strains, than in the strains that lack genes of toxin and pilus production). It is established that the level of extracellular cadaverine production is greater than that of intracellular; but correlation of the parameters depends upon the oxygen and carbon dioxide concentration in the environment. Intracellular cadaverine is mainly generated at a high oxygen concentration (10–12 %); while under extreme hypoxia (<1 % O<sub>2</sub>) and in case of carbon dioxide level increase (9–13 %), its production markedly declines.

**Key words:** polyamines, cadaverine, cholera vibrio, persistence, adaptation, hypoxia.

**Conflict of interest:** The authors declare no conflict of interest.

Corresponding author: Yulia V. Sizova, e-mail: E-mail: plague@aaanet.ru.

Citation: Sizova Yu.V., Pisanov R.V., Burlakova O.S., Cherepakhina I.Ya., Balakhnova V.V. The Role of Cadaverine in Cholera Vibrio Adaptation to Stress Conditions, Induced by Hypoxia. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2016; 2:87–90. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2016-2-87-90

Проблема адаптации микроорганизмов к стрессу является одной из наиболее актуальных в современной микробиологии. Доказано, что воздействие неблагоприятных факторов способствует формированию у микроорганизмов универсальных механизмов защиты. В качестве таких неспецифических адаптогенов, принимающих участие в процессе приспособления разнообразных организмов (от бактерий до растений и млекопитающих) к неблагоприятным условиям среды, некоторые авторы рассматривают полиамины, которые могут быть вовлечены в различные физиологические процессы, включая регуляцию экспрессии генов, трансляцию, пролиферацию клеток, модуляцию сигнализации клетки, стабилизацию мембран [7, 8]. Энергетические сигналы стресса воспринимаются ферментами синтеза полиаминов в клетке, что приводит к возрастанию концентрации этих соединений.

Известно, что полиамины – это большая группа низкомолекулярных азотсодержащих соединений, образующихся при декарбоксилировании аминокислот в кислой среде (кадаверин – из лизина, путресцин – из орнитина, агматин – из аргинина и т.д.), они представляют собой короткие углеводородные цепочки, состоящие из 4–10 углеродных атомов, которые содержат от 2 до 4 аминогрупп. Важнейшие из них, содержащиеся во всех живых клетках, – кадаверин [NH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>NH<sub>2</sub>], путресцин [NH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NH<sub>2</sub>], спермидин [NH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-NH(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NH<sub>2</sub>] и спермин [NH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-NH(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NH<sub>2</sub>] – являются универсальными, полифункциональными молекулами [3].

Показано влияние полиаминов на устойчивость условно-патогенных бактерий (*E. coli*, *P. aeruginosa* и др.) к окислительному, кислотному, тепловому и другим видам стресса за счет их антиоксидантных

свойств [2], а также за счет способности ингибировать проницаемость пориновых каналов клеточной стенки, как бы обособливая микробную клетку от вредного окружения с помощью полиаминов [3, 5, 6].

Сведения о продукции полиаминов при стрессорном воздействии на возбудителя холеры в литературе практически отсутствуют. Одним из видов стресса на холерные вибрионы в кишечнике человека является резкое изменение газового состава среды обитания. В желудочно-кишечном тракте человека содержится около 200 мл различных газов, среди которых кислород составляет 0–12 %, углекислый газ – 6–13 %. Концентрация кислорода при переходе от тонкого к толстому кишечнику постепенно снижается за счет всасывания с 21 до 1 % и ниже, а углекислоты, напротив, повышается с 6 до 13 % и выше [1].

Целью настоящего исследования явилось изучение влияния газовой среды обитания на продукцию холерными вибрионами одного из основных полиаминов – кадаверина, являющегося одним из индикаторов стрессового ответа.

### Материалы и методы

В работе использовано 14 штаммов *V. cholerae* El Tor, 2 – *V. cholerae* classical, 2 – *V. cholerae* O139, имеющих различный набор детерминант патогенности, выделенных от больных и из речной воды.

Для проведения опыта в бульон Мартена вносили взвеси суточных агаровых культур холерных вибрионов и культивировали в течение 4 сут при 37 °С в микроаэрофильных условиях – в эксикаторе (10–12 % O<sub>2</sub> и 5 % CO<sub>2</sub> – имитация газовой среды тонкого отдела кишечника – I вариант) и в анаэробном состоянии с газ-пакетами AnaeroGen, обеспечивающими газовый состав с содержанием кислорода не более 1 % и CO<sub>2</sub> 9–13 % (как в толстом отделе кишечника – II вариант).

Продукцию кадаверина определяли по методике S.Cortacero-Ramirez *et al.* [4] с нашими модификациями (патент RU 2566558). Для определения внутриклеточного и внеклеточного кадаверина полученные бульонные культуры холерных вибрионов после инкубации центрифугировали, супернатанты переносили в отдельные пробирки, а к осадку добавляли 150 мкл дистиллированной воды. К обеим пробам добавляли 50 мкл 200 мМ раствора гидрокарбоната натрия. В качестве контрольного компонента использовали FITC-дериваты коммерческого кадаверина (производство фирмы «Sigma») в концентрации 1 мг/мл. Полученные смеси, в том числе и контрольную, прогревали при 99 °С в течение 30 мин в твердотельном термостате «Термит» и вносили в них 100 мкл 10 мМ раствора FITC в 80 % ацетоне и 200 мкл 50 % ацетона, после чего пробы инкубировали 2 ч в термостате «Гном» при температуре 50 °С. Далее добавляли во все пробы 500 мкл деионизированной воды, перемешивали и центрифугировали 5 мин при 13000 об/мин.

Полученные пробы исследовали в системе ка-

пиллярного электрофореза Backman. Результаты выводились в виде электрофореграммы: при подаче напряжения в систему FITC-кадаверин достигал зоны детекции и регистрировался в виде пика свечения 520 нм при длине возбуждения 488 нм аргонным лазером. Полученные с помощью электрофореграмм цифровые выражения пиков опытных и контрольных образцов позволяли определять количество продуцируемого кадаверина у исследуемых штаммов холерных вибрионов по формуле:

$$C = \frac{P_o \cdot C_k}{P_k},$$

где C – концентрация кадаверина исследуемого штамма холерных вибрионов, мкг/мл; C<sub>к</sub> – концентрация кадаверина в контрольной пробе, мкг/мл; P<sub>о</sub> – цифровое выражение пика опытного образца; P<sub>к</sub> – цифровое выражение пика контрольного образца.

Все результаты статистически обработаны.

### Результаты и обсуждение

При варьировании газовой среды, соответствующей ее составу по кислороду и углекислому газу в кишечнике (как в I, так и во II варианте), холерные вибрионы Эль Тор образовывали как внутриклеточный, так и внеклеточный кадаверин в значительном количестве. При этом средние суммарные показатели продукции этого полиамина в I варианте (имитирующем тонкий кишечник, в котором происходят все основные события патогенеза холеры) оказались несколько выше, чем во II варианте (имитирующем толстый кишечник) – 1156,6 мкг/мл против 974,25.

Обращает на себя внимание снижение значений суммарной продукции кадаверина в каждой из групп вибрионов Эль Тор по мере снижения эпидемической значимости: в I варианте – с 453,2 мкг/мл у ctx<sup>+</sup>tcp<sup>+</sup> и 425 мкг/мл у ctx<sup>-</sup>tcp<sup>+</sup> штаммов до 277,0 мкг/мл у ctx<sup>-</sup>tcp<sup>-</sup> штаммов (39 и 35 % соответственно); во II варианте концентрация кадаверина снижалась меньше от 345,6 и 333,4 мкг/мл до 295,25 мкг/мл (на 15 и 11 % соответственно).

Классические холерные вибрионы, представленные двумя токсигенными штаммами, по активности не уступали холерным вибрионам Эль Тор из такой же группы ctx<sup>+</sup>tcp<sup>+</sup> штаммов: суммарное значение при культивировании в I варианте составило 450,0 мкг/мл и 383,2 мкг/мл – во II.

Максимальным суммарным значением характеризовался токсигенный штамм O139 серогруппы (502,0 и 481,0 мкг/мл), показания у атоксигенного штамма были гораздо ниже, особенно в I варианте (всего 61,0 мкг/мл).

При этом обращает на себя внимание, что у всех штаммов с генотипом ctx<sup>+</sup>tcp<sup>+</sup> и ctx<sup>-</sup>tcp<sup>+</sup> (Эль Тор, классических и O139) суммарные значения показателей продукции кадаверина в I группе были выше, чем во II, то есть для патогенных и потен-

циально патогенных вибрионов стрессом, вероятно, являлась более высокая концентрация кислорода (10–12 %); у авирулентных штаммов (ctx<sup>-</sup>tcp<sup>-</sup>) Эль Тор и O139, напротив, значения во II группе были выше, чем в I, то есть для этих штаммов более стрессовыми были условия высокой концентрации углекислоты (12–13 %).

При ранжировании штаммов вибрионов Эль Тор по источнику выделения суммарные показатели уровней продукции кадаверина в группах выглядели следующим образом (таблица).

Показатели кадаверина в группах отличались незначительно. Несколько более высокие показатели суммарной продукции кадаверина (как в I, так и во II варианте) отмечены в группе штаммов, выделенных от вибрионосителей (431 и 443,7 мкг/мл). Для сравнения: от больных – 377,8 и 316,3 мкг/мл; из воды – 365,3 и 274,2 мкг/мл. При этом установлено, что такие высокие показатели продукции кадаверина в группе носителей обусловлены одним ctx<sup>-</sup>tcp<sup>+</sup> штаммом *V. cholerae* El Tor (488 и 520 мкг/мл). Является ли этот результат характерным для всей группы ctx<sup>-</sup>tcp<sup>+</sup> штаммов, выделенных на протяжении последних десяти лет от носителей, предстоит выяснить впоследствии, хотя (судя по данным, полученным при изучении таких же изолятов от больных и из воды) не исключено, что речь может идти об индивидуальных особенностях некоторых штаммов. Если не принимать во внимание результаты, полученные при исследовании этой культуры, можно констатировать, что при ранжировании штаммов по источнику выделения внутри каждой группы наблюдалась та же динамика снижения продукции кадаверина в зависимости от степени патогенности штаммов (от больных: с 470,5 до 246 мкг/мл в I группе, с 350 до 298 – во II; от носителей: с 404 до 401 мкг/мл в I группе, с 442 до 369 мкг/мл – во II; из воды: с 460,5 до 230,5 в I группе, с 293 до 257 мкг/мл – во II).

Установлено, что суммарный уровень продукции кадаверина в обоих вариантах опыта у всех штаммов

холерных вибрионов, выделенных из организма человека (больного или носителя), был несколько выше, чем у водных штаммов, что свидетельствует о более эффективном использовании данной защитной системы в организме человека именно такими штаммами.

При анализе продукции внутриклеточного и внеклеточного кадаверина в разных условиях опытов наблюдалось преобладание внеклеточного кадаверина, но в разной степени. В экспериментах, имитирующих газовую среду тонкого кишечника (I вариант – 10–12 % O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub>), суммарное среднее количество внутриклеточного кадаверина составляло 456,7 мкг/мл, внеклеточного – 698,9 мкг/мл, (соотношение 1:1,5), то есть разница в продукции кадаверина незначительная. Мы ранее в этой работе предположили, что эти условия могут быть достаточно стрессовыми для холерных вибрионов, поскольку ни в толстом кишечнике, ни в водных объектах окружающей среды нет такой высокой концентрации кислорода. В ответ на стресс происходит синтез полиаминов, которые защищают холерные вибрионы как путем заполнения пориновых каналов (внутриклеточный кадаверин), так и путем изоляции клеток от вредного окружения (внеклеточный кадаверин), способствуя тем самым сохранению популяции возбудителя и развитию патологического процесса в тонком кишечнике.

Совершенно другая картина наблюдалась при моделировании условий газовой среды в толстом кишечнике (II вариант – 1 % O<sub>2</sub>, 9–13 % CO<sub>2</sub>). При низкой концентрации кислорода и высокой углекислоты соотношение внутриклеточного и внеклеточного кадаверина составляло уже 1:4, то есть приоритетной была продукция внеклеточного кадаверина, необходимого для внешней защиты клеток вибрионов. Возможно стрессором в данной модели опыта служила именно повышенная концентрация CO<sub>2</sub>.

Таким образом, при экспериментальном моделировании газовой среды кишечника, в котором осуществляется развитие патологического процесса (адгезия, колонизация, токсинопродукция), показано,

Продукция кадаверина холерными вибрионами Эль Тор, выделенными из различных источников

Источник выделения	Наличие генов		Культивирование в условиях эксикатора (10 % O <sub>2</sub> , 5 % CO <sub>2</sub> ) I вариант (кадаверин)			Культивирование в условиях газ-пакета (1 % O <sub>2</sub> , 12 % CO <sub>2</sub> ) II вариант (кадаверин)		
			внутриклеточный, мкг/мл	внеклеточный, мкг/мл	сумма	внутриклеточный, мкг/мл	внеклеточный, мкг/мл	сумма
Больные	+	+	189,5	281,0	470,5	16,5	333,5	350,0
	-	+	144,5	270,0	414,5	29,0	272,0	301,0
	-	-	101,0	145,0	246,0	46,0	252,0	298,0
Среднее по группе			145,0	232,0	<b>377,0</b>	30,5	285,8	<b>316,3</b>
Носители	+	+	154,0	250,0	404,0	176,0	266,0	442,0
	-	+	221,0	267,0	488,0	151,0	369,0	520,0
	-	-	149,0	252,0	401,0	94,0	275,0	369,0
Среднее по группе			174,7	256,3	<b>431,0</b>	140,3	303,3	<b>443,7</b>
Вода	+	+	181,5	279,0	460,5	34,0	259,0	293,0
	-	+	180,0	225,0	405,0	53,5	219,0	272,5
	-	-	82,0	148,5	230,5	22,0	235,0	257,0
Среднее по группе			147,8	217,5	<b>365,3</b>	36,5	237,7	<b>274,2</b>

что холерные вибрионы реагируют на неблагоприятные условия окружающей среды путем продукции кадаверина, одного из полиаминов, являющихся неспецифическими антистрессовыми адаптогенами.

При этом количество продуцируемого кадаверина в определенной степени коррелирует с патогенностью культур (оно выше у эпидемически значимых и потенциально эпидемически значимых штаммов, чем у штаммов, лишенных генов токсино- и пиле-продукции).

Установлено, что при использовании обеих моделей газовой среды кишечника уровень продукции внеклеточного кадаверина выше, чем внутриклеточного, но соотношение этих показателей зависит от концентрации кислорода и углекислоты в окружающей среде. В условиях газовой среды тонкого кишечника (10–12 % O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub>) оно практически равно (1:1,5), в условиях толстого кишечника (1 % O<sub>2</sub>, 10–12 % CO<sub>2</sub>) преобладает синтез внеклеточного кадаверина (соотношение 1:4).

Внутриклеточный кадаверин, «запечатывающий» пориновые каналы микробных клеток, образуется, в основном, при условии высокой концентрации кислорода (10–12 %), при выраженной гипоксии (<1 % O<sub>2</sub>) и повышении уровня углекислого газа (9–13 %) его количество резко снижается.

**Конфликт интересов.** Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бутурова Л.И. Синдром избыточного газообразования при заболеваниях желудочно-кишечного тракта. <http://www.disbak.ru/php/content.php?id=1446> (дата обращения 20.06.2015 г.).
2. Ткаченко А.Г., Федотова М.В. Зависимость защитных функций полиаминов *Escherichia coli* от стрессорных воздействий супероксидных радикалов. *Биохимия*. 2007; 72(1):128–36.
3. Ткаченко А.Г. Молекулярные механизмы стрессорных ответов у микроорганизмов. Екатеринбург: УрО РАН; 2012. 267 с.
4. Cortacero-Ramirez S., Arrarez-Romarn D., Segura-Carretero A., Fernandez-Gutierrez A. Determination of biogenic amines in

beers and brewing-process samples by capillary electrophoresis coupled to laser-induced fluorescence detection. *Food Chemistry*. 2007; 100:383–9. DOI: 10.1016/j.foodchem.2005.09.037.

5. De la Vega A.L., Delcour A.H. Cadaverine induces closing of *E. coli* porins. *EMBO J*. 1995; 14:6058–65. PMC394726.

6. De la Vega A.L., Delcour A.H. Polyamines decrease *Escherichia coli* outer membrane permeability. *J. Bacteriol*. 1996; 178:3715–21. PMC232627.

7. Kusano T., Berberich T., Tateda C., Takahashi Y. Polyamines: essential factors for growth and survival. *Planta*. 2008; 228:367–81. DOI: 10.1007/s00425-008-0772-7.

8. Rhee J.Y., Lee S.H., Singh A.P., Chung G.C., Ahn S.J., Detoxification of hydrogen peroxide maintains the water transport activity in figleaf gourd (*Cucurbita ficifolia*) root system exposed to low temperature. *Physiol. Plant*. 2007; 130(2):177–84. DOI: 10.1111/j.1399-3054.2007.00895.x.

#### References

1. Buturova L.I. [Syndrome of excessive gas in case of gastrointestinal diseases]. [Cited 20 Jun 2015]. Available from: <http://www.disbak.ru/php/content.php?id=1446>.
2. Tkachenko A.G., Fedotova M.V. [The correlation between protective functions of *Escherichia coli* polyamines and stress effects of super-oxide radicals]. *Biokhimiya*. 2007; 72(1):128–36.
3. Tkachenko A.G. [Molecular Mechanisms of Stress Responses in Microorganisms]. Yekaterinburg: Ural Branch of RAS; 2012. 267 p.
4. Cortacero-Ramirez S., Arrarez-Romarn D., Segura-Carretero A., Fernandez-Gutierrez A. Determination of biogenic amines in beers and brewing-process samples by capillary electrophoresis coupled to laser-induced fluorescence detection. *Food Chemistry*. 2007; 100:383–9. DOI: 10.1016/j.foodchem.2005.09.037.
5. De la Vega A.L., Delcour A.H. Cadaverine induces closing of *E. coli* porins. *EMBO J*. 1995; 14:6058–65. PMC394726.
6. De la Vega A.L., Delcour A.H. Polyamines decrease *Escherichia coli* outer membrane permeability. *J. Bacteriol*. 1996; 178:3715–21. PMC232627.
7. Kusano T., Berberich T., Tateda C., Takahashi Y. Polyamines: essential factors for growth and survival. *Planta*. 2008; 228:367–81. DOI: 10.1007/s00425-008-0772-7.
8. Rhee J.Y., Lee S.H., Singh A.P., Chung G.C., Ahn S.J., Detoxification of hydrogen peroxide maintains the water transport activity in figleaf gourd (*Cucurbita ficifolia*) root system exposed to low temperature. *Physiol. Plant*. 2007; 130(2):177–84. DOI: 10.1111/j.1399-3054.2007.00895.x.

#### Authors:

Sizova Yu.V., Pisanov R.V., Burlakova O.S., Cherepakhina I.Ya., Balakhnova V.V. Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute. 117/40, M.Gor'kogo St., Rostov-on-Don, 344002, Russian Federation. E-mail: plague@aaanet.ru.

#### Об авторах:

Сизова Ю.В., Писанов Р.В., Бурлакова О.С., Черепяхина И.Я., Балахнова В.В. Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 344002, Ростов-на-Дону, ул. М.Горького, 117/40. E-mail: plague@aaanet.ru.

Поступила 29.06.15.