

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М.В. Ломоносова

Биологический факультет

На правах рукописи



ШИШОВ Владимир Александрович

**БИОГЕННЫЕ АМИНЫ В ДИНАМИКЕ РОСТА
МИКРООРГАНИЗМОВ**

Специальность 03.02.03 – микробиология

**Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Москва

2010

**Работа выполнена на кафедре иммунологии Биологического факультета
Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова**

Научный руководитель

доктор биологических наук ОЛЕСКИН Александр Владимирович

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук ЮДИНА Татьяна Георгиевна

кандидат биологических наук НИКОЛАЕВ Юрий Александрович

Ведущая организация:

**Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения
Российской Академии наук**

Защита диссертации состоится: «7» **декабря** 2010 г. в **15.30** на заседании диссертационного совета Д.501.001.21 при Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова по адресу: 119991, Москва, Ленинские горы., д.1, корп. 12, Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, ауд. М-1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Биологического факультета МГУ

Автореферат разослан «2» **ноября** 2010 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета, к.б.н.



Н.Ф. ПИСКУНКОВА

Актуальность темы диссертации. Тема диссертации - исследование ростовой динамики накопления биогенных аминов (БА) в биомассе и культуральной жидкости микроорганизмов – непосредственно связана с одной из самых «горячих» областей современной микробиологии – изучением механизмов межклеточной коммуникации у микроорганизмов. Важным частным случаем межклеточной коммуникации являются quorum sensing-системы, ставящие протекающие в микробной клетке процессы под контроль плотности популяции микроорганизмов. Были охарактеризованы важнейшие типы quorum sensing-феромонов, в том числе функционирующие у энтеробактерий и ряда других микроорганизмов ароматические сигнальные вещества (аутоиндуктор(ы) AI-3), напоминающие по химической структуре катехоламины – одну из групп БА, функционирующих в качестве нейромедиаторов и гормонов у животных и человека.

Вопрос о роли БА в микробных системах был длительное время предметом внимания исследователей – проф. М. Лайта (университет Манкато, США), групп Г.Я. Фрайкина и А.В. Олескина (биологический факультет, МГУ) и др. Продемонстрировано, что БА вызывают стимуляцию роста микроорганизмов, обуславливают структурные эффекты в микробных системах, в частности, усиливают или, напротив, ослабляют агрегацию клеток в колониях, влияют на подвижность и (в случае патогенов) вирулентность микроорганизмов, а также на формирование микробных биоплёнок (Sperandio et al., 2003; Clarke et al., 2006; Анучин и др., 2008). Клетки про- и эукариотических микроорганизмов содержат БА,

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

БА – биогенные амины; ВЭЖХ - высокоэффективная жидкостная хроматография; ГВК - гомованилиновая кислота; 5-ГИУК - 5-гидроксииндолилуксусная кислота; 5-ГТ - серотонин (5-гидрокситриптамиин); ДОФА – диоксифенилаланин; ДА - дофамин; ДГФУК - дигидроксифенилуксусная кислота; ЖКТ – желудочно-кишечный тракт; MAO - моноаминоксидаза; НА – норадреналин; КЖ –культуральная жидкость; QS – quorum sensing (система плотностно-зависимой коммуникации у микроорганизмов).

определённые (Цавкелова и др., 2000) методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

Несмотря на эти данные, в наших знаниях о БА у микроорганизмов остаются серьёзные пробелы. В частности, в литературе не были представлены данные о возрастной динамике внутриклеточного содержания нейромедиаторных аминов, т. е. об изменении их концентраций по мере прохождения микробной культурой различных фаз своего роста. Не был решён имеющий теоретическое и прикладное значение вопрос, высвобождаются ли биогенные амины или их продукты в среду культивирования или остаются внутри клеток или во фракции межклеточного матрикса.

Цель диссертации: провести идентификацию нейромедиаторных аминов, а также их предшественников и окисленных продуктов в клетках и культуральной жидкости и выяснить возрастную динамику их содержания в культурах грамотрицательных и грамположительных бактерий, а также одноклеточных эукариот.

Задачи диссертации:

1. Количественно определить методом ВЭЖХ биогенные амины (серотонин, дофамин, норадреналин) в биомассе и культуральной жидкости на разных стадиях роста *Escherichia coli* K-12, *Saccharomyces cerevisiae* 230 и *Bacillus cereus* IVB.
2. Количественно определить предшественники и продукты окислительного дезаминирования биогенных аминов в биомассе и культуральной жидкости в динамике роста исследуемых микроорганизмов.

Научная новизна диссертации. В диссертационной работе впервые прослежена динамика концентраций БА, их предшественников и продуктов окисления в биомассе и супернатанте культуральной жидкости (КЖ) грамотрицательной (*E. coli*) и грамположительной (*B. cereus*) бактерий, а также одноклеточного эукариота *S. cerevisiae*. На базе полученных данных сделан вывод о биосинтезе и деградации БА в микробных системах с

участием характерных для животных ферментов или их аналогов. В сочетании с данными литературы, наши результаты позволяют выдвинуть гипотезу об ауторегуляторной роли БА в популяциях прокариот и об односторонней регуляции эукариотических объектов (на примере дрожжей) прочими компонентами экосистемы посредством БА и их производных.

Практическое значение диссертации. Полученные результаты свидетельствуют о выработке БА, их предшественников и окисленных продуктов важными для человека микроорганизмами – симбионтом *E. coli*, потенциальным патогеном *B. cereus*, а также биотехнологическим объектом *S. cerevisiae*. Встаёт существенный с медицинской точки зрения вопрос о воздействии микробных БА на организм человека в норме и патологии, а также об опосредованных БА взаимодействиях в пределах населяющего организм микробного сообщества. Некоторые из вырабатываемых взаимодействующими с человеком микроорганизмами соединений проникают через гемато-энцефалический барьер и могут оказывать влияние на деятельность функциональных зон мозга, включая высшие психические функции и социальное поведение людей. Обнаружение БА в КЖ микроорганизмов обуславливает потенциальную перспективность биотехнологического проекта по превращению микробных клеток в фабрики нейромедиаторов или родственных им соединений.

Апробация диссертации. Основные положения диссертации были доложены на конференции по микробиологии на кафедре физиологии микроорганизмов Биологического факультета МГУ (2009), на конференции Микробиологического общества при РАН (2009), неоднократно на заседаниях семинара «Биополитика» (секция МОИП) в 2008–2010 гг.

Структура и объем диссертации. Диссертация включает 122 страницы и состоит из введения, обзора литературы, методического раздела, разделов о результатах исследований и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Библиография включает 114 источников, в том числе 38 на русском языке и 76 на иностранных языках.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В обзоре литературы тематика экспериментальной части – эндогенные нейромедиаторные амины у микроорганизмов – ставится в контекст популяционно-коммуникативного направления в микробиологии, занятого надклеточной организацией микроорганизмов (причём особое внимание в обзоре уделено биоплёнкам) и межклеточной коммуникацией. В частности, детально обсуждены феромоны (аутоиндукторы) quorum sensing-систем, участвующих в формировании, развитии и распаде биоплёнок, в том числе и существующих в организме человека, в особенности в кишечнике. Отдельно рассматривается воздействие на микроорганизмы биогенных аминов (БА), функционирующих как нейромедиаторы в организме животных и человека. В частности, влияние одной из групп БА – катехоламинов – на рост микробных культур, подвижность клеток, вирулентность (в случае патогенной микрофлоры), образование биоплёнок и др. связано с quorum sensing-системой с аутоиндуктором AI-3 – аналогом катехоламинов (Clarke et al., 2006). Изложены данные предшествующих исследований эффектов БА в микробных системах, выполненных в лаборатории А.В. Олескина (Олескин и др., 1998а, б; 2009а; Цавкелова и др., 2000; Кагарлицкий и др., 2003; Олескин, Кировская, 2006; Анучин и др., 2008).

Завершающий подраздел обзора литературы посвящён имеющимся в литературе данным о содержании БА и их метаболитов в клетках микроорганизмов, в частности, определяемых методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (Цавкелова и др., 2000). Показано наличие серотонина в биомассе грамположительных бактерий *Bacillus subtilis* и *Staphylococcus aureus*, а катехоламины оказались широко распространены у тестируемых прокариот. Однако в литературе до сих пор не представлены данные о возрастной динамике внутриклеточного содержания БА, т. е. об изменении их концентраций по мере прохождения микробной культурой различных фаз своего роста. Не ясно, синтезируются ли детектированные внутри клеток микроорганизмов амины de novo или захватываются клетками

из среды. Не решён вопрос, высвобождаются ли БА или их продукты в среду культивирования или остаются внутри клеток или во фракции межклеточного матрикса. Поиск ответов на все эти вопросы послужил отправной точкой для экспериментальной части настоящей диссертационной работы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В начале данного раздела охарактеризованы свойства объектов настоящей работы - представители грамотрицательных (*Escherichia coli*, симбиотический штамм K-12 MC4100) и грамположительных (*Bacillus cereus* штамм IVB) бактерий, а также одноклеточных эукариот (дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* штамм 230). Эти микроорганизмы имеют очевидное биотехнологическое и биомедицинское значение: кишечная палочка как симбионт в толстом кишечнике человека и продуцент генноинженерных продуктов (инсулин, интерфероны и др.), дрожжи как пробиотик и весьма важный биотехнологический объект, а *B. cereus* как фактор порчи пищевых продуктов и потенциальный патоген.

Бактерию *E. coli* K-12 культивировали при 37°C на богатой органической среде Luria-Bertani (LB) или, альтернативно, на синтетической среде M-9 с глюкозой; *B. cereus* – при 30°C на богатой среде Сабуро; дрожжи *S. cerevisiae* – при 32°C на среде Сабуро или на синтетической сахарозо-аммонийной среде. Для всех объектов были исследованы кривые их роста (в случае *E. coli* и *S. cerevisiae* – отдельно для каждой из использованных сред), по трём параметрам: 1) оптическая плотность; 2) вес плотного осадка биомассы; 3) вес абсолютно сухой биомассы (АСБ), полученной доведением образца до постоянного веса по стандартной методике (графики приведены в диссертации).

На основе кривых роста выбраны характерные точки, соответствовавшие лаг-фазе, ранней и поздней экспоненциальной фазе и стационарной фазе роста культур: 1) *E. coli*, среда LB: 1.5; 3; 6; 24 часа; 2) *E. coli*, среда M-9: 2; 5;

8; 24 часа; 3) *B. cereus*: 1; 3; 8; 24 часа; 4) *S. cerevisiae*, среда Сабуро: 2; 4.5; 8; 24 часа; 5) *S. cerevisiae*, сахарозо-аммонийная среда: 2; 5; 9; 24 часа. За время культивирования (24 часа) избранного штамма *B. cereus* не наблюдалось формирования эндоспор – культура содержала лишь вегетативные клетки. Дрожжевая культура не образовывала псевдомицелий за 24 часа на испытанных средах. Большинство клеток дрожжей на всех стадиях роста были диплоидными (крупными эллипсоидными почкующимися) клетками.

Для количественной детекции низких (в том числе следовых) концентраций веществ необходимы методы, обеспечивающие высокую чувствительность определения примесей при слабой чувствительности к основным веществам в сложных смесях, характерных для микробных систем (бактериальные и дрожжевые клетки), изученных в настоящей работе. Избранный в работе метод амперометрической детекции «основан на измерении электрического тока, возникшего при окислении... анализируемого вещества на поверхности рабочего электрода, находящегося под определённым потенциалом» (Яшин, Яшин, 2002. С.109). БА и их дериваты окисляются при контакте с рабочим стеклоугольным электродом; в частности, катехоламины переходят в *p*-хинонимины. Наряду с разделяемыми и регистрируемыми с помощью электрохимической детекции (электродетекции) веществами, анализируемый раствор содержит внутренний стандарт – 3.4-дигидроксибензиламин (ДГБА) в заранее заданной концентрации. Электродетекции предшествует обращенно-фазовая ВЭЖХ в изократическом режиме.

Клетки всех исследованных микроорганизмов отделяли центрифугированием в течение 15 мин при 5000 g. Супернатант культуральной жидкости (КЖ) собирали, чтобы определить содержание БА также и в ней.

Осаждённую биомассу суспендировали в дистиллированной воде, после чего вновь центрифугировали в течение 15 мин при 5000 g для отмывания компонентов КЖ. Данная методика обеспечивала получение очищенного и

достаточно плотного осадка биомассы влажностью 80-90%, как показало сравнение данных о весе АСБ и сырой биомассы. Биомассу ресуспендировали в буферном растворе, содержащем 0.5 мкМ 3,4-диоксибензиламин в качестве внутреннего стандарта для последующего определения БА, их предшественников и метаболитов методом ВЭЖХ с электродетекцией. Биомассу охлаждали до 0°C и далее разрушали ультразвуковой обработкой (22 кГц) в течение 2.5 мин (бактерии) или 8 мин (дрожжи), после чего отделяли неразрушенные клетки и фрагменты клеток центрифугированием в течение 15 мин при 10000 g; полноту разрушения клеток контролировали микроскопическим методом. В полученном супернатанте определяли БА.

Необходимо было также определить «фоновые» БА, их предшественники и продукты, вносимые в момент посева культуры со средой и инокулятом. Для этой цели образец среды с только что внесенным инокулятом клеток центрифугировали в течение 15 мин при 5000 g для осаждения клеток. Супернатант собирали для определения БА.

Образцы КЖ, среды или супернатанта разрушенной биомассы в количестве 20 мкл наносили на аналитическую колонку Ultrasphera C₁₈, методом прямой инъекции. Определение БА, их предшественников и метаболитов проводили методом ВЭЖХ с электродетекцией на хроматографе LC-304T (“BAS”, West Lafayette, США) с инжектором Rheodyne 7125, петля для нанесения образцов 20 мкл.

Изучаемые вещества разделяли на термостатируемой при 25°C обращённо-фазной колонке ReproSil-Pur, ODS-3, 4x100 мм, размер частиц 3 мкм (“Dr.Majsch GMBH”, «Элсико», Москва). Был использован насос РМ-80 (BAS, США), скорость элюции подвижной фазы – 1.0 мл/мин, давление 2.0 атм. Мобильная фаза содержала 0.1 М цитратно-фосфатный буфер, с 1.1 мМ октансульфоновой кислоты, 0.1 мМ ЭДТА и 9% ацетонитрила (рН 3.0). Измерение проводили на стеклоугольном электроде (+0.85 V) против Ag/AgCl электрода (Кудрин и др., 1988).

Результаты представляют собой медианы, вычисленные на базе 4-5 опытов, статистическую обработку результатов производили, используя методы экспресс-анализа (Ашмарин, Воробьёв, 1962): метод медианы и критерий Менн-Уитнея. Все концентрации биогенных аминов, их окисленных продуктов и предшественника ДОФА, в КЖ и среде выражали в *мкмоль/л (мкМ)*, в биомассе – в *нмоль/г* сырой биомассы (плотный осадок), что соответствует, очевидно, *мкмоль/кг* биомассы. Эти единицы позволяют сравнивать данные в биомассе и КЖ, ибо 1 л воды имеет вес 1 кг. В диссертации приведены коэффициенты влажности (в %) для каждой культуры, среды и точки кривой роста (всюду – в диапазоне 80-90%).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Биогенные амины, их предшественники и продукты в клетках и культуральной жидкости E. coli K-12. Клетки культуры *E. coli* K-12, выращенные на органической среде LB или на синтетической среде M-9, содержали во всех ростовых фазах, помимо детектированного в работе (Цавкелова и др., 2000) дофамина (ДА), также норадреналин (НА) и серотонин (5-ГТ) (рис. 1, А и Б). Биомасса *E. coli* содержала вещества, служащие предшественниками БА в организме животных и человека (рис. 2) – 5-гидрокситриптофан (5-ГТР) и диоксифенилаланин (ДОФА), а также характерные продукты окислительного дезаминирования катехоламинов (рис. 3) – дигидроксифенилуксусную кислоту (ДФУК) и гомованилиновую кислоту (ГВК) и серотонина – 5-гидроксииндолилуксусную кислоту (5-ГИУК). Из рис. 1 видно, что максимальные концентрации нейромедиаторов присутствуют в биомассе в начальных фазах роста культуры *E. coli* – в лаг-фазе или, в случае ДА на среде LB, в ранней экспоненциальной фазе. По мере «старения» культуры наблюдается тенденция к снижению концентраций БА внутри клеток *E. coli*.

Преобладающим БА в клетках культуры *E. coli* на обеих средах был НА, его максимальная концентрация составляла, по медианам, 1.5 нмоль/г биомассы на среде М-9 и 2.6 нмоль/г биомассы на среде LB. Другой катехоламин, ДА, присутствовал в клетках *E. coli* в меньших концентрациях, за исключением только ранней экспоненциальной фазы на среде М-9, когда

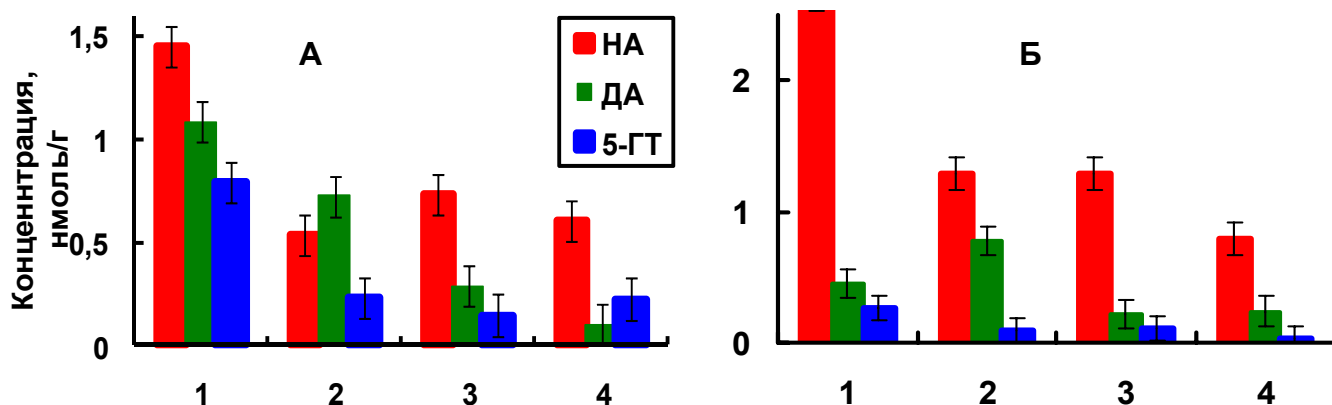


Рис. 1. Концентрации БА в биомассе *E. coli* К-12 на средах М-9 (А) и LB (Б). Подписи на оси абсцисс здесь и далее: 1 – лагфаза; 2 – ранняя экспоненциальная фаза; 3 – поздняя экспоненциальная фаза; 4 – стационарная фаза роста.

концентрация ДА незначительно превышала таковую НА. 5-ГТ присутствовал в биомассе *E. coli* на обеих средах приблизительно в тех же концентрациях, что ДА, и его содержание также снижалось по мере «старения» культуры.

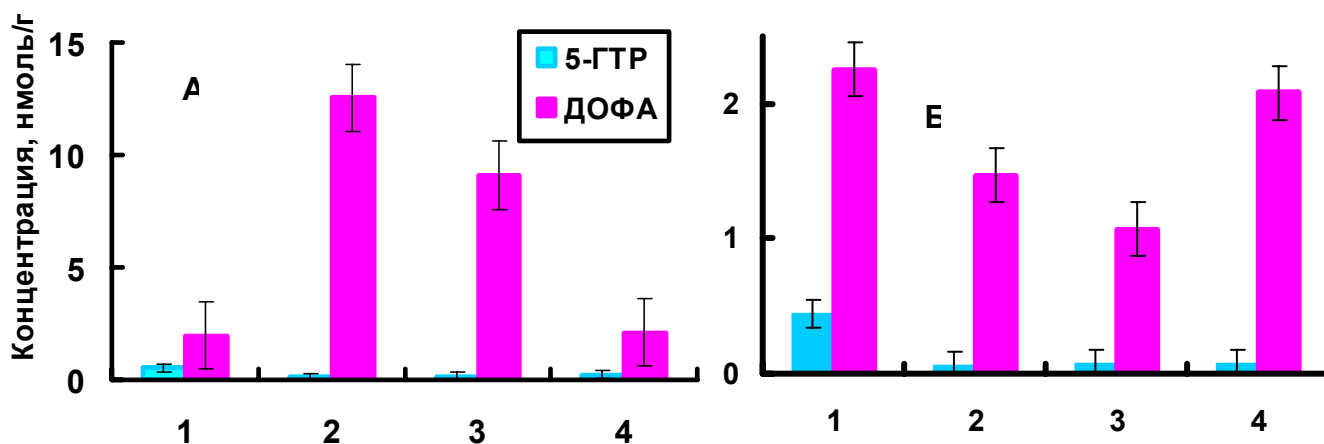


Рис. 2. Концентрации предшественников БА в биомассе *E. coli* К-12 на средах М-9 (А) и LB (Б).

Аналогичная закономерность прослеживается и в отношении предшественника серотонина (5-ГТР). Предшественник катехоламинов ДОФА присутствовал на среде М-9 в концентрациях порядка 1 нмоль/г во время лаг-фазы; эта концентрация возрастала при переходе к экспоненциальной фазе и снижалась к стационарной фазе. Концентрация ДОФА в клетках на стадии лаг-фазы на среде LB была того же порядка, что и на среде М-9; в дальнейшем эта концентрация снижалась, вновь достигая «лаг-фазного» уровня в стационарной фазе.

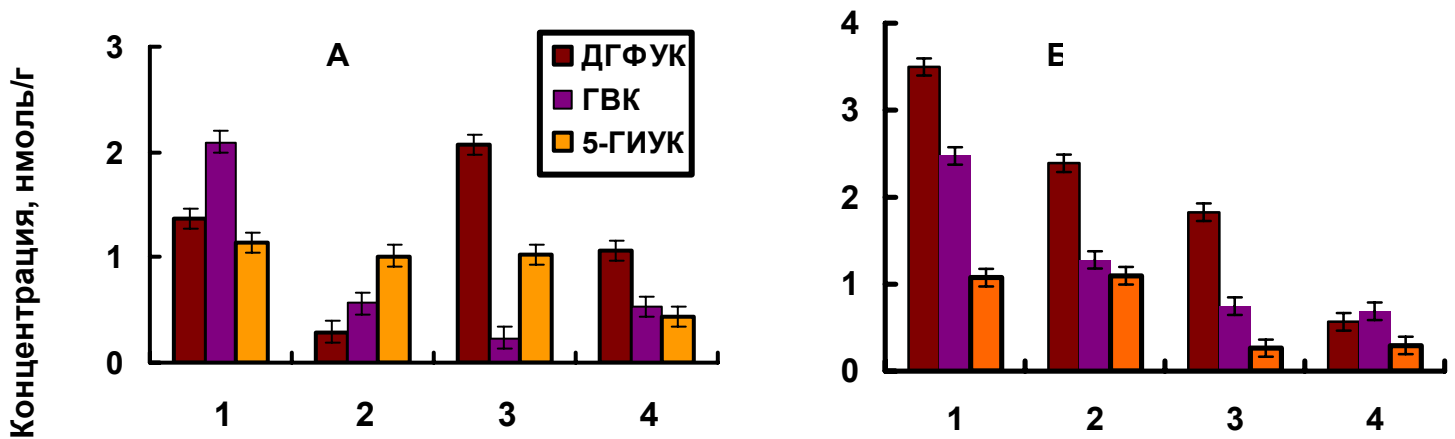


Рис. 3. Концентрации продуктов окислительного дезаминирования БА в биомассе *E. coli* К-12 на средах М-9 (А) и LB (Б).

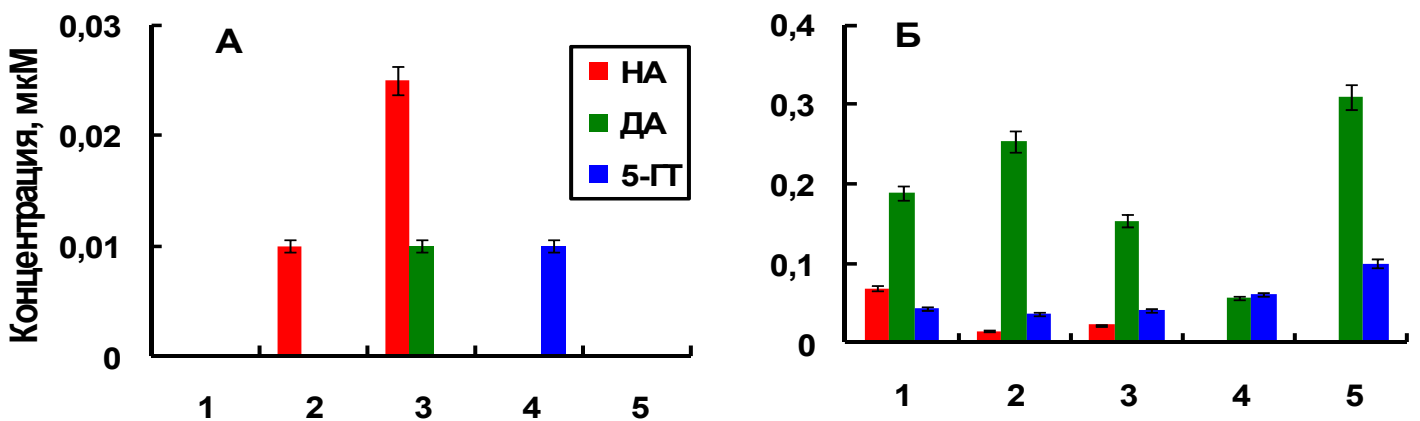


Рис. 4. Концентрации БА в КЖ *E. coli* К-12 на средах М-9 (А) и LB (Б). Подписи на оси абсцисс здесь и далее: 1 – лаг-фаза; 2 – ранняя экспоненциальная фаза; 3 – поздняя экспоненциальная фаза; 4 – стационарная фаза роста; 5 – супернатант среды с инокулятом.

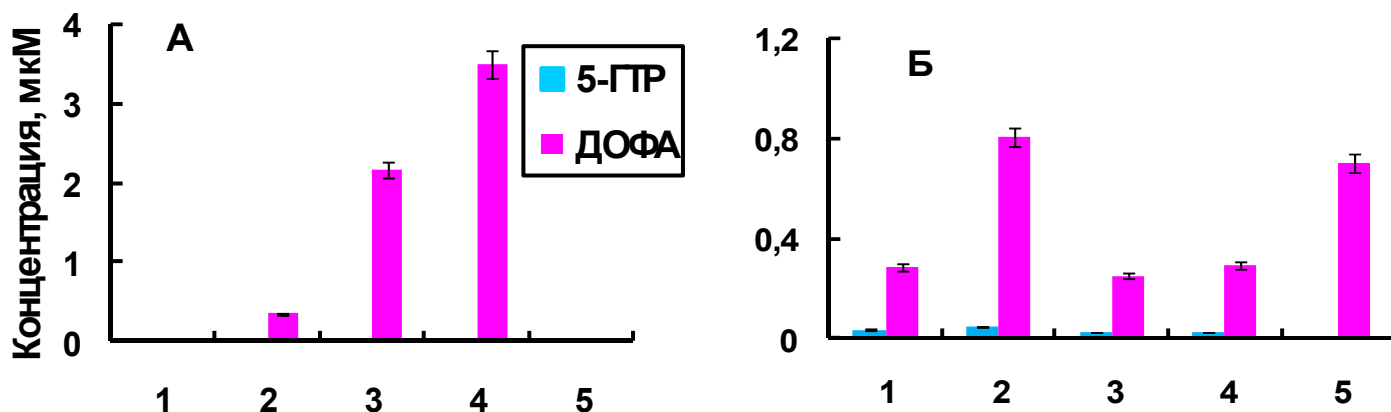


Рис. 5. Концентрации предшественников БА в КЖ *E. coli* K-12 на средах М-9 (А) и LB (Б).

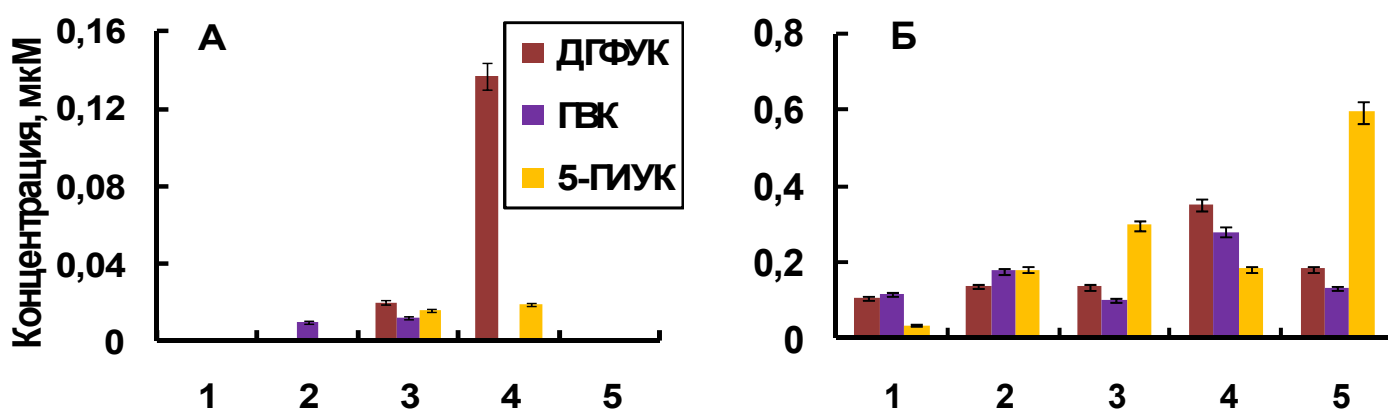


Рис. 6. Концентрации продуктов окислительного дезаминирования БА в КЖ *E. coli* K-12 на средах М-9 (А) и LB (Б).

Обратимся к данным, полученным с КЖ *E. coli*. При росте на синтетической среде М-9 КЖ не содержал БА во время лагфазы (рис. 4). В КЖ ранней экспоненциальной фазы нами детектированы низкие (наномолярные) концентрации НА, поздней экспоненциальной фазы – НА и ДА, стационарной фазы – 5-ГТ. Продукты окислительного дезаминирования БА присутствуют в КЖ *E. coli*, растущей на среде М-9 (рис.6), в поздних фазах роста культуры в наномолярных концентрациях (кроме ДГФУК, который достигает субмикромольного уровня в стационарной фазе). Предшественник 5-ГТ 5-гидрокстриптофан не был детектирован нами в КЖ на среде М-9 ни в какой фазе роста культуры (рис. 5). В то же время

предшественник дофамина ДОФА присутствует в КЖ в микромолярных концентрациях.

В отличие от среды М-9, среда LB изначально содержала субмикромолярные концентрации ДА, 5-ГТ, ДОФА и продуктов окисления БА. В этих условиях культура не выделяла значительных дополнительных количеств изучаемых веществ в КЖ. Концентрации этих веществ в КЖ во всех фазах роста на среде LB в большинстве случаев были примерно равны концентрациям в среде сразу после инокуляции или даже ниже их, т.е. можно предположить поглощение соответствующих соединений клетками *E. coli* из среды (рис. 5 и 6).

Биогенные амины, их предшественники и продукты в клетках и культуральной жидкости *S. cerevisiae*. Две среды, использованные нами для культивирования дрожжей – среда Сабуро и синтетическая сахарозо-аммонийная среда, различались по концентрациям изучаемых соединений в момент инокуляции. Среда Сабуро содержала микромолярные концентрации НА, предшественника катехоламинов ДОФА и одного из детектируемых методом ВЭЖХ продуктов окислительного дезаминирования катехоламинов – ДГФУК; другие тестируемые вещества – нейромедиаторы ДА и 5-ГТ, ГВК и 5-ГИУК – присутствовали в среде Сабуро в концентрациях $\sim 10^{-7}$ М. В синтетической среде тотчас после посева дрожжевой культуры были детектированы лишь наномолярные количества ДОФА, НА, 5-ГИУК и ГВК, очевидно, внесённые вместе с инокулятом.

Несмотря на различия в составе среды, в разрушенной ультразвуковой обработкой биомассе дрожжей, выращенной на обеих питательных средах, содержались 5-ГТ, НА, ДА (рис. 7), ДОФА, ДГФУК, ГВК и 5-ГИУК (Табл. 1 и 2) в концентрационном диапазоне от 0.1 до 10 нмоль/г². Максимальные концентрации 5-ГТ, ДГФУК, ГВК и 5-ГИУК на обеих средах приходились на начало экспоненциальной фазы роста, их концентрации снижались по мере

² За исключением ДГФУК в поздней экспоненциальной фазе на синтетической среде, чья концентрация была равна нулю.

старения культуры. Концентрации катехоламинов на среде Сабуро достигали максимума в лаг-фазе. На синтетической среде максимальная концентрация НА наблюдалась в начале экспоненциальной фазы роста, а максимальная концентрация ДА - в лаг-фазе.

Концентрация ДОФА внутри клеток *S.cerevisiae* на среде Сабуро (табл. 2) была максимальной в ранней экспоненциальной фазе и снижалась при переходе к поздней экспоненциальной фазе, а на синтетической (сахарозо-аммонийной) среде (табл. 1) внутриклеточная концентрация ДОФА монотонно нарастала по мере старения культуры. На синтетической среде, где сразу после добавки инокулята были детектированы только НА, ДОФА, ГВК и 5-ГИУК в низких (наномолярных) концентрациях, в биомассе были детектированы все тестируемые вещества в значительных количествах (рис. 7, Табл. 1).

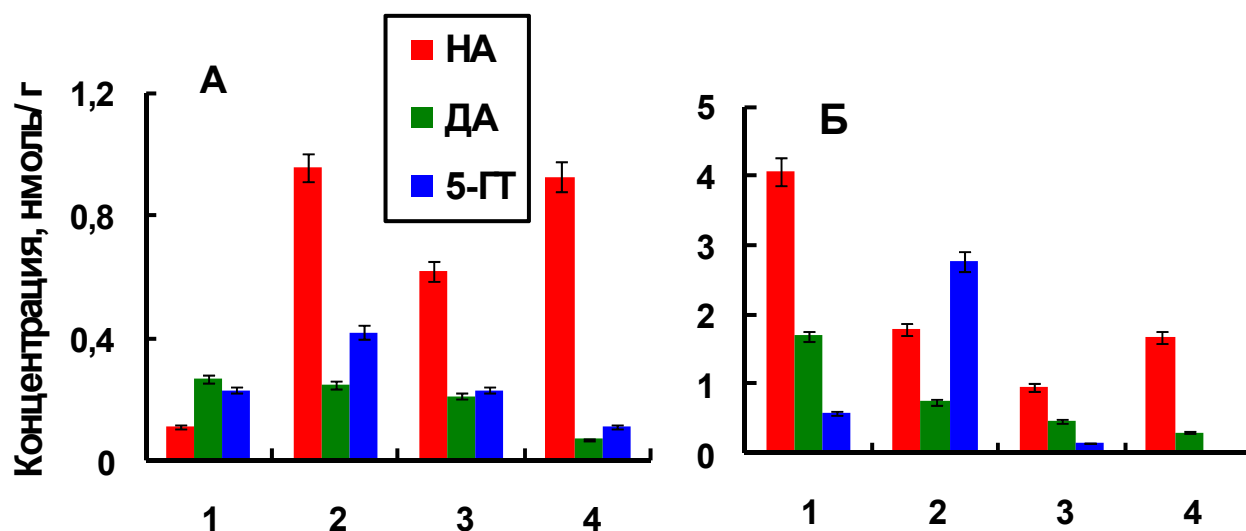


Рис. 7. Концентрации БА в биомассе *S. cerevisiae* на сахарозо-аммонийной среде (А) и среде Сабуро (Б). Подписи на оси абсцисс здесь и далее: 1 – лагфаза; 2 – ранняя экспоненциальная фаза; 3 – поздняя экспоненциальная фаза; 4 – стационарная фаза роста; 5 – супернатант среды с инокулятом

На среде Сабуро содержание БА (рис. 8), продуктов дезаминирования и предшественника ДОФА в КЖ (Табл. 2) на всех стадиях роста культуры было ниже, чем в среде в момент инокуляции, т. е. клетки дрожжей активно поглощали данные соединения в процессе роста из среды.

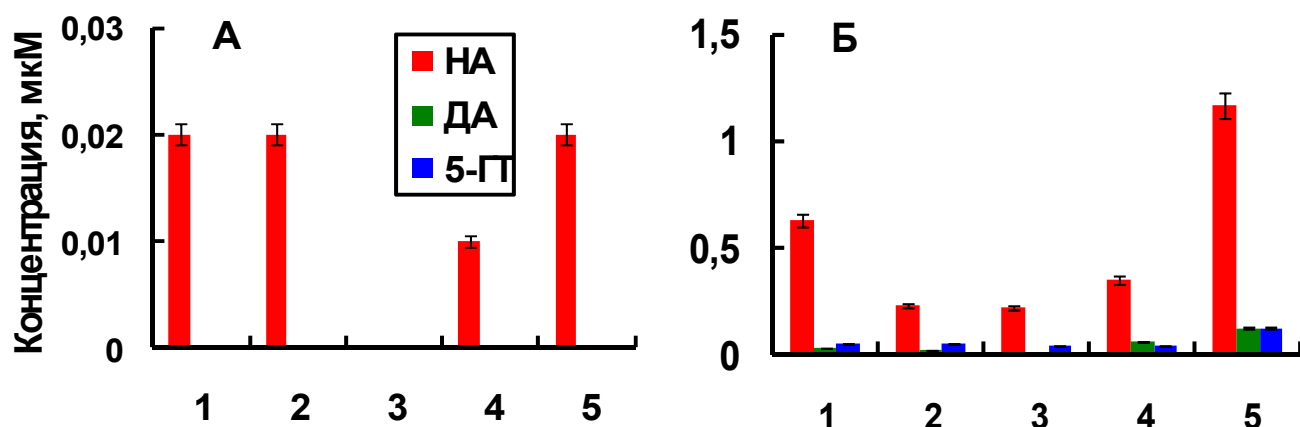


Рис. 8. Концентрации БА в КЖ *S. cerevisiae* на сахарозо-аммонийной среде (А) и среде Сабуро (Б).

Таблица 1. Концентрации предшественников и продуктов дезаминирования БА в биомассе (нмоль/г) и КЖ (мкМ) *S. cerevisiae* на сахарозо-аммонийной среде. Примечание к табл. 1 и 2.: 5-ГТР не был детектирован ни в биомассе, ни в КЖ *S. cerevisiae*

Фаза	ДОФА	ДФУК	ГВК	5-ГИУК
Биомасса				
Лаг-фаза	0,82±0,1	0,06±0,007	0,58±0,06	0,16±0,02
Ранн. экспоненц.	0,94±0,1	0,3±0,03	0,59±0,06	0,71±0,07
Поздн. Экспоненц.	1,25±0,2	0	0,39±0,04	0,44±0,05
Стационарная	2,05±0,4	0,02±0,002	0,23±0,02	0,37±0,04
Культуральная жидкость				
Лаг-фаза	0,01±0,001	0	0	0
Ранн. экспоненц.	0,03±0,004	0	0,01±0,001	0,01±0,001
Поздн. Экспоненц.	0,02±0,003	0,01±0,001	0	0,02±0,002
Стационарная	0,01±0,001	0	0	0,01±0,001
Среда + инокулят	0,02±0,002	0	0,01±0,001	0,01±0,001

Максимальные концентрации БА, ДОФА и продуктов дезаминирования в КЖ на синтетической среде или соответствуют тем наномолярным концентрациям, которые содержались в супернатанте среды с инокулятом – ДОФА, НА, 5-ГИУК, ГВК, или равны нулю, если соответствующие соединения не детектированы в супернатанте в момент инокуляции – ДА, 5-ГТ, ДГФУК. Эти данные свидетельствует против выделения из клеток в среду каких-либо из исследованных веществ, тем более что на богатой среде,

как уже было указано, их концентрации в КЖ не возрастали, а снижались при росте культуры по сравнению с моментом инокуляции.

Таблица 2. Концентрации предшественников и продуктов дезаминирования БА в биомассе (нмоль/г) и КЖ (мкМ) *S. cerevisiae* на среде Сабуро

Фаза	ДОФА	ДФФУК	ГВК	5-ГИУК
Биомасса				
Лаг-фаза	16,7±1,7	0,79±0,09	1,97±0,2	0,73±0,1
Ранн. экспоненц.	22±2,6	0,98±0,1	2,74±0,5	1,27±0,15
Поздн. Экспоненц.	6,1±0,9	0,1±0,02	0,18±0,3	0,93±0,1
Стационарная	7,2±0,9	0,11±0,02	0,15±0,03	0,84±0,1
Культуральная жидкость				
Лаг-фаза	0,8±0,08	0,48±0,05	0,12±0,01	0,1±0,01
Ранн. экспоненц.	0,49±0,05	0,29±0,03	0,18±0,02	0,03±0,003
Поздн. Экспоненц.	0,78±0,08	0,26±0,03	0,17±0,02	0,07±0,008
Стационарная	0,33±0,03	0,17±0,02	0,16±0,02	0,04±0,005
Среда + инокулят	0,77±0,08	1,79±0,2	0,19±0,02	0,15±0,02

Биогенные амины, их предшественники и продукты в клетках и культуральной жидкости *B. cereus*. Судя по данным ВЭЖХ (рис. 9; Табл. 3), использованная для культивирования *B. cereus* среда Сабуро с сахарозой содержала лишь 22 нМ НА (медиана; в масштабе гистограммы рис. 9, Б не отличима от нуля) и в ней не было детектируемых количеств других тестируемых веществ. Подобно системе *E. coli*, значительные концентрации преобладавшего внутри клеток НА (медиана 2.3 нмоль/г) и ДА (медиана 0,24 нмоль/г) содержались на ранних стадиях роста культуры. Однако концентрация НА вновь резко возрастала к стационарной фазе. ДОФА присутствовал в высоких концентрациях на поздних стадиях – в поздней экспоненциальной фазе его внутриклеточное содержание достигало 13 нмоль/г биомассы *B. cereus*. Прочие тестируемые компоненты присутствовали в незначительных количествах, например, 5-ГТ накапливался лишь до уровня 42 пкмоль/г на стадии ранней экспоненциальной фазы. В культуральной жидкости на поздних стадиях детектированы НА и ДОФА – оба вещества в микромолярных концентрациях.

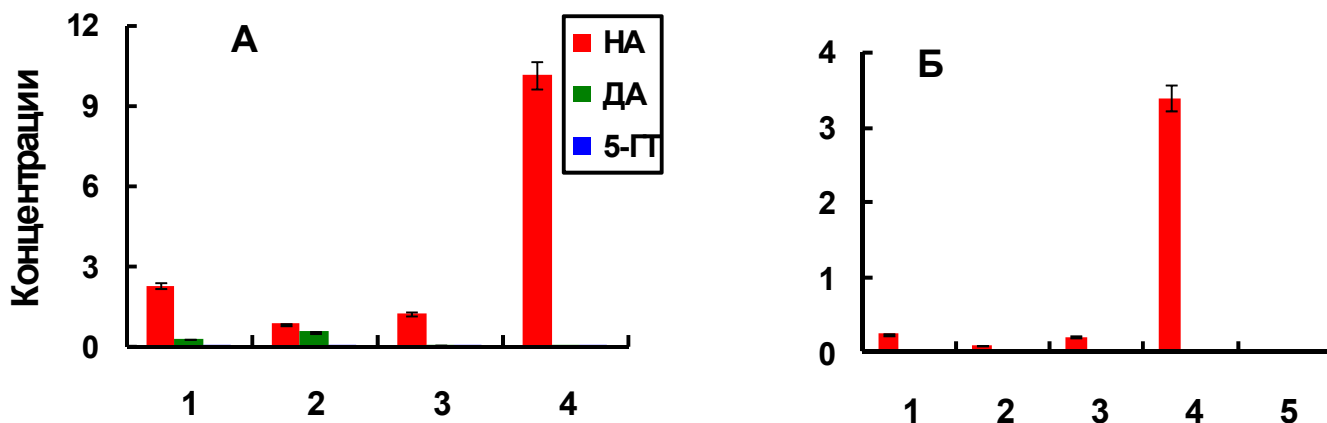


Рис. 9. Концентрации БА в биомассе в нмоль/г (А) и КЖ в мкМ (Б) *B. cereus*. Подписи на оси абсцисс: 1 – лагфаза; 2 – ранняя экспоненциальная фаза; 3 – поздняя экспоненциальная фаза; 4 – стационарная фаза роста; 5 – супернатант среды с инокулятом.

Таблица 3. Концентрации предшественников и продуктов дезаминирования БА в биомассе (нмоль/г) и КЖ (мкМ) *B. cereus*. Примечание: 5-ГТР не был детектирован ни в биомассе, ни в КЖ *B. cereus*

Фаза	ДОФА	ДФУК	ГВК	5-ГИУК
Биомасса				
Лag-фаза	1,7±0,2	0,097±0,01	0,18±0,02	0,15±0,02
Ранн. экспоненц.	4,9±0,5	0,13±0,02	0,23±0,03	0,45±0,05
Поздн. Экспоненц.	13,1±1,4	0,039±0,004	0,06±0,01	0,17±0,02
Стационарная	8,72±0,9	0,2±0,02	0,25±0,03	0,25±0,03
Культуральная жидкость				
Лag-фаза	0,14±0,02	0	0	0,1±0,01
Ранн. экспоненц.	0,07±0,01	0	0,03±0,004	0,03±0,004
Поздн. Экспоненц.	0,18±0,02	0,02±0,002	0	0,04±0,005
Стационарная	1,15±0,2	0,36±0,04	0,02±0,002	0,01±0,001
Среда + инокулят	0,005±0,001	0	0,03±0,004	0

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящей диссертационной работе мы обсуждаем не только собственные экспериментальные данные, но и сведения из литературных источников, включая работы группы А.В. Олескина. Примечательным с точки зрения консерватизма живого на химическом уровне является сам факт наличия в клетках микроорганизмов важнейших нейромедиаторов нервной системы и,

что особенно актуально, головного мозга животных и человека –5-ГТ, НА и ДА. Данный факт был ранее продемонстрирован Цавкеловой и др. (2000). Однако в экспериментальной части настоящей диссертационной работы информация о нейромедиаторных аминах в микробных системах существенно детализирована и дополнена данными о ростовой динамике их накопления в биомассе и КЖ применительно к представителям грамотрицательных (*E. coli*) и грамположительных (*B. cereus*) бактерий, а также одноклеточных эукариот (*S. cerevisiae*).

Следует поставить вопрос, являются ли обнаруженные нами амины **эндогенными**? Синтезируются ли они внутри клеток микроорганизмов или поглощаются из среды? Ответ на этот вопрос дают результаты опытов по культивированию *E. coli* и *S. cerevisiae* не только на богатых органических средах (среде LB и среде Сабуро, соответственно), но и на синтетических средах (среде М-9 и сахарозо-аммонийной среде, соответственно), где БА и их предшественники могут быть внесены в незначительных количествах лишь с инокулятом. Клетки микроорганизмов содержат нейромедиаторные амины НА, ДА и 5-ГТ в концентрациях порядка 0.1-1 нмоль/г биомассы на синтетических средах, вполне сопоставимым с их содержанием в клетках на богатых органических средах. Бактерия *B. cereus* была выращена нами только на богатой органической среде Сабуро, однако из числа БА эта среда содержала лишь 22 нмоль/л НА; тем не менее, биомасса содержала до 2 нмоль/г, т.е. 2 мкмоль/кг НА и вовсе не содержащиеся в среде в момент инокуляции ДА и 5-ГТ. Таким образом, внутриклеточное накопление нейромедиаторов по крайней мере частично является результатом их биосинтеза *de novo*, а не только захвата из среды.

Поскольку в клетках микроорганизмов содержались вещества, которые служат предшественниками БА в организме животных и человека – ДОФА, предшественник катехоламинов, и 5-гидрокситриптофан, предшественник серотонина (правда, детектированный только в клетках *E. coli*) и продукты окислительного дезаминирования нейромедиаторов – ДГФУК, ГВК и

концентрации НА и появлением в супернатанте отсутствовавших в среде ДА и 5-ГТ.

Наибольшие количества БА содержались внутри клеток на ранних стадиях роста микробных культур – в лаг-фазе или, в случае ДА у *B. cereus* и *E. coli* (на среде LB) и 5-ГТ у *S. cerevisiae* (на обеих использованных средах), в ранней экспоненциальной фазе. Эти данные следует сопоставить с тем фактом, что добавленные нейромедиаторы эффективно стимулируют рост культур *E. coli* К-12 (Олескин и др., 1998а, б; Кагарлицкий и др., 2003; Анучин и др., 2008) и *S. cerevisiae* (Кагарлицкий и др., 2003; Маликина и др., 2010) лишь в ранние фазы роста. Можно предположить, что эндогенные амины присутствуют в клетках бактерий в максимальных концентрациях именно в тех ростовых фазах, во время которых они оказывают свое регуляторное действие. В этом случае БА, вероятно, функционируют как «триггеры», активирующие рост и деление клеток в начальных фазах онтогенеза культуры, по аналогии с известными ауторегуляторными соединениями.

Преобладающим БА в клетках всех микробных культур в большинстве случаев был НА. ДА присутствовал в клетках в значительно меньших концентрациях, чем НА, за исключением только ранней экспоненциальной фазы у *E. coli* на среде М-9 и лаг-фазы у *S. cerevisiae* на сахарозо-аммонийной среде, когда концентрация ДА несколько превышала таковую НА. 5-ГТ присутствовал в биомассе тестируемых микробных объектов примерно в тех же концентрациях, что и ДА.

Эффективность БА в роли стимуляторов роста у *E. coli* (Олескин и др., 1998а, б; Кагарлицкий и др., 2003; Анучин и др., 2008) и *S. cerevisiae* (Маликина и др., 2010), убывает в последовательности: ДА > 5-ГТ > НА. Можно поэтому предположить, что НА присутствует в клетках *E. coli* в концентрациях, почти достаточных для полного проявления его регуляторного воздействия, и дополнительная добавка вызывает поэтому лишь мизерный эффект (что и наблюдалось в работе: Анучин и др., 2008).

Большой ростстимулирующий эффект 5-ГТ (Олескин и др., 1998а; Анучин и др., 2008) и особенно ДА (Кагарлицкий и др., 2003; Анучин и др., 2008) коррелирует с их сравнительно низкой концентрацией в биомассе.

Приведенные данные подкрепляют высказанную в работе (Анучин и др., 2008) идею о специфических рецепторах для каждого из аминов. В частности, насыщение эндогенным норадреналином специфических к нему рецепторов не препятствует проявлению эффекта экзогенного ДА, т.е. можно предположить наличие как дофаминовых, так и норадреналиновых рецепторов. В пользу наличия специфических рецепторов для каждого из аминов свидетельствует и то, что тестированные амины по-разному влияют на агрегацию клеток *E. coli*: ДА ингибирует, а НА и 5-ГТ (а также гистамин) стимулируют этот процесс (Анучин и др., 2008).

Представляют значительный интерес наши данные о выделении *E. coli* в синтетическую среду М-9 НА, ДА и 5-ГТ в концентрациях порядка 10 нМ. Хотя концентрации нейромедиаторных аминов в культуральной жидкости низки, они вполне достаточны для специфического ответа клеток хозяина, несущих соответствующие рецепторы (например, D-рецепторы к ДА, α -адренорецепторы для НА). Некоторые из этих рецепторов узнают не только наномолярные, но даже пикомолярные концентрации нейромедиаторов. Наномолярные или субнаномолярные концентрации нейромедиаторных аминов характерны для внутренних сред животного организма. Например, в крови крыс содержится 0.1–0.3 нМ катехоламинов (Сейдахметова, Ташенова, 2005). Все это указывает на возможные физиологические эффекты аминов, вырабатываемых кишечным симбионтом *E. coli*.

Концентрация клеток *E. coli* в наших опытах на среде М-9 составляла порядка 5×10^8 клеток/мл (данные получены прямым подсчётом клеток в полях зрения микроскопа) в поздней экспоненциальной фазе, когда в среде содержались максимальные концентрации катехоламинов. Эта плотность клеточной популяции сопоставима с той, которая характерна для толстого

кишечника человека (где содержится до 10^8 колониобразующих единиц *E. coli* в 1 мл, Шендеров, 2001).

Особый интерес представляет тот факт, что предшественник ДА ДОФА присутствует не только внутри клеток *E. coli* (см. выше), но и в КЖ в микромолярных концентрациях на синтетической среде. Как отмечено выше, данные о внутриклеточном содержании ДОФА, ДА и НА указывают на ферментативное превращение ДОФА \rightarrow ДА \rightarrow НА в клетках *E. coli*. Можно предположить, что ДОФА выступает в качестве сигнала дальнего радиуса действия, диффундируя от одной колонии или локальной группы клеток к другой. Его превращение в ДА, который является стимулятором роста культуры *E. coli* К-12 (Кагарлицкий и др., 2003; Анучин и др., 2008), может происходить внутри поглотившей ДОФА клетки. Известный уже более ста лет феномен сокращения лаг-фазы бактериальной культуры под воздействием КЖ другой культуры во время экспоненциальной фазы роста (Rahn, 1904; Penfold, 1914) может быть объяснен, наряду с другими уже найденными аутоstimуляторами (см. Вахитов, Петров, 2006), также и воздействием ДОФА, выделенного «экспоненциальной» культурой и рецептированного чувствительной культурой во время лаг-фазы.

Аналогично *E. coli*, в КЖ *B. cereus* на поздних стадиях роста культуры нами были обнаружены НА и ДОФА. Поэтому всё сказанное выше о гипотетической роли ДОФА как стимулятора роста клеток в микробном сообществе (одно- или многовидовом) и его воздействии на организм-хозяин приложимо и к бактерии *B. cereus*. Эта бацилла портит пищевые продукты и входит в состав микрофлоры человека. Поэтому продуцируемый бациллой НА может оказывать влияние на другие населяющие различные ниши человеческого организма бактерии, в том числе патогенные. НА эффективно стимулирует рост и вирулентность патогенной микрофлоры, в частности, сальмонелл, шигелл, синегнойной палочки *Pseudomonas aeruginosa* (Lyte, Ernst, 1993; Burton et al., 2002; Freestone et al., 2007). Итак, будучи условно

патогенной сама, бактерия *B. cereus* может причинять дополнительный вред, способствуя развитию других инфекций.

В отличие от *E. coli*, *S. cerevisiae* не выделяет в КЖ сколь-нибудь существенных количеств ни БА, ни их предшественник ДОФА. Например, если даже предположить что весь присутствующий в КЖ ДОФА будет ферментативно превращён поглотившей его клеткой дрожжей в дофамин, то и тогда его концентрация не превысит 0.03 мкМ (максимальная концентрация ДОФА в КЖ), что в ~30 раз меньше ростстимулирующей концентрации дофамина по данным работы А.В. Олескина с соавторами (2009а). Вероятно, ДОФА, как и другие детектированные вещества (БА и их продукты), не функционируют в популяциях дрожжей *S. cerevisiae* в качестве ауторегуляторов.

Можно поставить вопрос, зачем дрожжевые клетки поглощают из среды нейромедиаторные амины и специфически реагируют на них, если они не служат ауторегуляторами? В естественных условиях дрожжи формируют биоплёнки на коже винограда, слив и других плодов. Следует ожидать, что в природных экосистемах дрожжевые клетки вступают в обмен регуляторными веществами с другими видами про- и эукариотических микроорганизмов, а также с клетками растения-хозяина. Можно предполагать, что нейромедиаторы служат односторонне действующими регуляторами, воспринимаемыми дрожжами и вырабатываемыми другими компонентами экосистемы. БА обнаружены у растений и могли бы служить одним из каналов коммуникации растения и растущей на нём дрожжевой биоплёнки. Источниками аминов могут быть и бактерии: они, по нашим данным, не только накапливают нейромедиаторные амины внутриклеточно, но и выделяют их в среду.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Наряду с данными литературы о распространённости нейромедиаторных аминов у различных животных (Дубынин и др., 2003), растений (Рощина, 1991), грибов, простейших (Бузников, 1987, 2007), наши результаты

свидетельствуют об эволюционно-консервативном характере рассматриваемых соединений, по-видимому, возникших на заре эволюции жизни на нашей планете. Причём, полученные нами данные о БА внутри микробных клеток дополняют собой описанные в литературных источниках (Lyte, Ernst, 1993; Страховская и др., 1993; Олескин и др., 1998а, б, 2009а; Kinney et al., 1999; Burton et al., 2002; Кагарлицкий и др., 2003; Олескин, Кировская, 2006, 2007; Freestone et al., 2007а, б; Анучин и др., 2008) факты, говорящие о специфических эффектах экзогенных БА в микробных системах.

В диссертационной работе нами были избраны объекты, так или иначе взаимодействующие с человеческим организмом и влияющие на его состояние здоровья, включая деятельность мозга, и тем самым на мышление, психику, социальное поведение. Не случайно исследуемые нами вещества служат нейромедиаторами в важных функциональных зонах мозга.

Поэтому существенное значение имеют отмеченные выше факты выделения микроорганизмами, а именно бактериями *E. coli* и *B. cereus* концентраций БА, достаточных для специфической реакции со стороны клеток хозяина. Правда, ДА, НА и 5-ГТ не проходят гемато-энцефалический барьер и в основном действуют на человеческий организм локально (в случае кишечного симбионта *E. coli* – только в пределах кишечника).

В этом контексте необходимо привлечь особое внимание к нашим данным о выделении обеими бактериями микромолярных количеств ДОФА в культуральную жидкость. ДОФА проходит барьер между кишкой и кровяным руслом, между кровяным руслом и мозгом. В мозгу ДОФА превращается в ДА и далее НА, которые регулируют мозговые процессы, связанные с поддержанием общего уровня двигательной активности, эмоциональными реакциями на окружающий мир, социабельностью (коммуникативностью), лидерскими качествами, степенью агрессивности и др. Таким образом, выделение кишечным симбионтом *E. coli* микромолярных количеств ДОФА из клеток в среду позволяет нам поставить вопрос о

возможности влияния этой бактерии на психику и социальное поведение человека.

По контрасту с тестированными бактериальными объектами, дрожжи *S. cerevisiae* накапливают БА внутриклеточно, но не высвобождают их в КЖ. Этот факт имеет определённое значение с точки зрения влияния дрожжевых продуктов на организм человека. Человек издавна использует КЖ дрожжей (вино, пиво и др.). Если при приготовлении напитка КЖ отфильтровывается от клеток дрожжей, то полученный продукт не содержит нейромедиаторов (и остальных тестированных нами соединений). Однако если в пищеварительный тракт поступают дрожжевые клетки без термической обработки, то следует ожидать воздействия на организм человека нейромедиаторов, их предшественников и продуктов.

Полученные в настоящей работе результаты в сочетании с данными литературы характеризуют БА как весьма эволюционно-консервативные соединения и в то же время обогащают наши представления о механизмах «диалога» между человеческим организмом и его симбиотической и паразитической микробиотой важным новым – нейрохимическим – аспектом.

ВЫВОДЫ

1. Методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с электродетекцией продемонстрировано наличие биогенных аминов (серотонина, дофамина, норадреналина) в биомассе бактерий *Escherichia coli* K-12 и *Bacillus cereus*, а также дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*.
2. Впервые исследована ростовая динамика накопления биогенных аминов в микробных клетках и показано, что максимальные концентрации биогенных аминов обнаруживаются на ранних стадиях роста изученных микробных культур, т.е. именно в те ростовые фазы, в которые они оказывают максимальные рост-стимулирующие эффекты, по данным литературы.
3. По-видимому, биогенные амины синтезируются в микробных клетках *de novo*, так как присутствуют в биомассе микроорганизмов при

культивировании на не содержащих этих соединений средах; в то же время на средах неопределенного состава наши данные указывают на захват биогенных аминов из среды, по крайней мере, в случае *S. cerevisiae*.

4. В клетках исследованных микроорганизмов обнаружены характерные для животных клеток предшественники (ДОФА, 5-гидрокситриптофан) и окисленные продукты (дигидроксифенилуксусная кислота, гомованилиновая кислота, 5-гидроксииндолилуксусная кислота) биогенных аминов. Вероятно, пути ферментативного синтеза и деградации аминов в микробных клетках сходны с таковыми у животных и человека.
5. Биогенные амины, их предшественники и продукты обнаружены нами в культуральной жидкости *E. coli* и *B. cereus*, но не *S. cerevisiae*. Возможно, эти соединения функционируют в качестве ауторегуляторов в популяциях бактерий, но не дрожжей. Дрожжи в естественных экосистемах могут поглощать биогенные амины, вырабатываемые другими организмами и, возможно, находиться под их регуляторным влиянием.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. В.А. Шишов, Т.А. Кировская, В.С. Кудрин, А.В. Олескин. Нейромедиаторные амины, их предшественники и продукты окисления в биомассе и супернатанте культуры *Escherichia coli* К-12 // Прикл. биохим. микробиол. 2009. Т.45. № 5. С.550-554.
2. К.Д. Маликина, В.А Шишов, Д.И. Чувелёв, В.С. Кудрин, А.В. Олескин. Регуляторная роль нейромедиаторных аминов в клетках *Saccharomyces cerevisiae*// Прикл. биохим. микробиол. 2010. Т.46. № 6. С.672-677.
3. А.В. Олескин, В.А. Шишов. Микробные биоплёнки как сетевые структуры // Современные проблемы физиологии, экологии и биотехнологии микроорганизмов. Всероссийский симпозиум с международным участием /Отв. ред. А.И. Нетрусов, Н.Н. Колотилова. М.: МАКС Пресс. 2009. С.139
4. А.В. Олескин, В.А. Шишов, Т.А. Кировская, В.С. Кудрин. Нейромедиаторные амины, их предшественники и продукты окисления в биомассе и супернатанте культуры *Saccharomyces cerevisiae*. // Бюлл. МОИП. Отдел биологический. 2009. Т.114. № 2. С.78-82.
5. A.V. Oleskin, V.A Shishov, K.D. Malikina. Symbiotic biofilms and brain neurochemistry //Biofilms. Hauppauge (N.Y.): Novapublishers. 2010. In print.