

## Анализ индукции окислительного стресса, вызываемого производными гемина, с применением Lux–биосенсоров

К. А. Пономарёв,<sup>a</sup> Г. А. Желтухина,<sup>a@</sup> К. В. Сидорук,<sup>b</sup> В. Е. Небольсин<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Московский государственный университет тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова, 119571 Москва, Россия

<sup>b</sup>Государственный НИИ генетики и селекции промышленных микроорганизмов, 117545 Москва, Россия

<sup>c</sup>ООО «Фарминтерпрайсез», 119571 Москва, Россия

@E-mail: laboratory211@yandex.ru

Ранее в нашей лаборатории было показано, что производные гемина (ПГ) обладают выраженной пероксидазной активностью, причём они способны катализировать окисление восстановленных биологических субстратов (NADH) как перекисью водорода, так и модельной липофильной трет-бутилгидроперекисью. В продолжение этих исследований была продемонстрирована способность ПГ катализировать окисление полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) кислородом воздуха. В настоящей работе степень окислительного стресса определялась с использованием бактерии *E. coli* K-12, содержащей гибридные плазмиды, в состав которых встроены гены светящихся бактерий и кодирующие люциферазу и редуктазу, высоко чувствительные к перекиси водорода (Lux – биосенсоры).

**Ключевые слова:** Производные гемина, антибактериальное действие, перекиси, Lux-биосенсор, *E. coli* K-12, гибридная плаزمид.

## Analysis of Oxidative Stress Induced by Hemin Derivatives Using Lux–Biosensors

К. А. Ponomaryov,<sup>a</sup> Г. А. Zheltukhina,<sup>a@</sup> К. V. Sidoruk,<sup>b</sup> and V. E. Nebolsin<sup>c</sup>

<sup>a</sup>M.V. Lomonosov Moscow State University of Fine Chemical Technology, 119571 Moscow, Russia

<sup>b</sup>Research Institute for Genetics and Selection of Industrial Microorganisms, 117545 Moscow, Russia

<sup>c</sup>LTD “Pharmenterprises”, 119571 Moscow, Russia

@Corresponding author E-mail: laboratory211@yandex.ru

Luciferases are now widely used in studies of molecular genetics (gene-reporters), in biochemical assays in wide screening of chemical contamination of the environment (ecology), in genetic engineering works (selection), etc. The high sensitivity and ease of detection of the light signal with a help of luminometer or scintillation counter; a direct proportionality between the amount of the enzyme luciferase and intensity of bioluminescence in a wide range (up to ten orders of magnitude), the ability to measure with equal success the enzyme activity in vitro and in vivo, without the destruction of the cells, and other benefits determine the application of luciferases of the bacterial genes (*genes lux*) and eukaryotic (*genes luc*) origin in various genetic and biochemical tests, such as the search and analysis of the promoter and regulatory regions of DNA, by screening of DNA-tropic compounds, by measurement of ATP and other trace. Lux - biosensors are widely used in studies of genetic engineering and biotechnology, as well as for the detection of toxic agents (environmental monitoring).<sup>[1-3]</sup> Previously, we have shown that the derivatives of hemin (DH) have expressed peroxidase activity,<sup>[6]</sup> and they are able to catalyze the oxidation of the reduced biological substrates (NADH) by hydrogen peroxide and by a model lipophilic tert-butyl hydroperoxide. In continuation of these studies the DH were demonstrated to catalyze the oxidation of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) by oxygen. In this case, the calculated and indirect experimental methods with sufficient reliability the PUFA hydroperoxides were shown to participate in the chain oxidation catalysed by DH.<sup>[7]</sup> To develop this work the studies of creation of the best synthetic methods of amino acid and peptide DH are under way in our laboratory.<sup>[8,9]</sup>

Among the synthesized DH there were identified substances such as conjugates of hemin with esters of amino acids, which have strong antibacterial activity against Gram-positive bacteria, including drug-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. Ability of some of the synthesized DH to model the peroxidase enzyme functions, to increase the lipid peroxidation in the lipid membrane may determine the antimicrobial activity of DH.<sup>[10]</sup>

Considering the presence of bacteria lipids containing PUFAs in the cell membranes, we have undertaken the experiment, the purpose of which was to confirm the probability of involvement of reactive oxygen species (peroxides) in the interaction of DH with live bacteria, which can lead to the destruction of its membrane.

Here, the degree of oxidative stress was determined by the known method,<sup>[11]</sup> using the bacterium *E. coli* K-12, containing hybrid plasmids, which are embedded in the genes of luminous bacteria and encoding luciferase and the reductase, which are highly sensitive to hydrogen peroxide (*lux* - biosensors).

The threshold sensitivity of the biosensor with *PkatG* to hydrogen peroxide is about  $5 \cdot 10^{-6}$  M, which is about 10 times higher than the intracellular concentration of hydrogen peroxide ( $5 \cdot 10^{-7}$  M), formed in the process of breathing.<sup>[11]</sup>

As a result it was shown that the interaction of DH with live bacterium *E. coli* K-12 is accompanied by accumulation of peroxides. Thus, after 18 hours the concentration of peroxide was significant and greater than  $10^{-3}$  M, in some cases even at submicromolar concentrations. Amino acid derivatives Hemin 1, 2 and 3 were synthesized according to previously described methods.<sup>[8]</sup> Thus, when using *lux* - biosensor the oxidative stress as a part of DH antibacterial mechanism was confirmed at the interaction the living bacteria, what is in accordance with the catalytic activity at the oxidation of organic substrates by DH, identified earlier by physical and chemical methods.

**Keywords:** Hemin derivatives, antibacterial action, peroxides, *Lux*-biosensor, *E. coli* K-12, hybrid plasmids.

## Введение

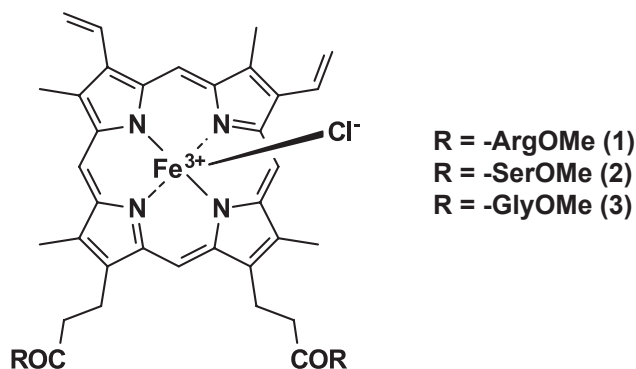
Люциферазы в настоящее время широко используются в работах по молекулярной генетике (гены-репортеры), при биохимических анализах, при массовом скрининге химических загрязнений окружающей среды (экология), в генно-инженерных работах (селекция) и др. Высокая чувствительность и простота детектирования светового сигнала с помощью люцинометра или сцинтилляционного счетчика, прямая пропорциональность между количеством ферментальной люциферазы и интенсивностью биолюминесценции в широких пределах (до десяти порядков величины), возможность с равным успехом измерять активность фермента как *in vitro*, так и *in vivo*, без разрушения клеток, и ряд других преимуществ определяют применение генов люцифераз как бактериального (гены *lux*), так и эукариотического (светлячкового, гены *luc*) происхождения в различных генетических и биохимических тестах как, например, при поиске и анализе промоторных и регуляторных участков ДНК, при скрининге ДНК-тропных соединений, при измерении микрочисел АТФ и других. *Lux*-биосенсоры, включающие люциферазы, широко используются в работах по генетической инженерии и биотехнологии, а также для детекции токсических агентов (мониторинг окружающей среды).<sup>[1-3]</sup> С помощью данных биосенсоров впервые был исследован механизм токсического действия на клетку 1,1-диметилгидразина (компонент ракетного топлива) и наночастиц диоксида титана. Показано, что основная роль в токсическом действии этих агентов связана с образующимися активными формами кислорода (перекись водорода и супероксид-анион).<sup>[4,5]</sup> В настоящей работе *Lux*-биосенсор был использован нами для исследования механизма антибактериального действия производных гемина (ПГ) при контакте с живой бактерией.

Ранее в нашей лаборатории было показано, что производные гемина (ПГ) обладают выраженной

пероксидазной активностью,<sup>[6]</sup> причём они способны катализировать окисление восстановленных биологических субстратов (NADH) как перекисью водорода, так и модельной липофильной *трет*-бутилгидроперекисью. В продолжение этих исследований была продемонстрирована способность ПГ катализировать окисление полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) кислородом воздуха. При этом расчётными и косвенными экспериментальными методами с достаточной степенью достоверности было показано участие гидроперекиси ПНЖК в процессе цепного окисления, катализируемого ПГ.<sup>[7]</sup>

В развитие этих работ в нашей лаборатории проводятся исследования по созданию оптимальных путей синтеза аминокислотных и пептидных ПГ.<sup>[8,9]</sup>

В ряду синтезированных ПГ общей формулы I (Рисунок 1) выявлены вещества, в частности конъюгаты гемина с эфирами аминокислот, обладающие выраженной антибактериальной активностью в отношении грамположительных микроорганизмов, в том числе резистентных штаммов *Staphylococcus aureus*. Способность ряда синтезированных ПГ моделировать ферментативные функции



**Рисунок 1.** Общая формула I синтетических производных гемина.

пероксидаз, усиливать ПОЛ в липидной мембране может определять антимикробную активность ПГ.<sup>[10]</sup>

Учитывая наличие в составе клеточных мембран бактерий липидов, содержащих ПНЖК, мы предприняли эксперимент, целью которого было подтверждение вероятности участия активных форм кислорода (пероксидов) в процессе взаимодействия ПГ с живой бактерией, которое может приводить к деструкции её мембраны.

В настоящей работе степень окислительного стресса определялась по методике<sup>[11]</sup> с использованием бактерии *E. coli K-12*, содержащей гибридные плазмиды, в состав которых встроены гены светящихся бактерий и кодирующие люциферазу и редуктазу, высоко чувствительные к перекиси водорода (Lux-биосенсоры).

Пороговая чувствительность биосенсора с *PkatG* к перекиси водорода составляет около  $5 \cdot 10^{-6}$  М, что примерно в 10 раз превышает внутриклеточную концентрацию перекиси водорода ( $5 \cdot 10^{-7}$  М), формирующуюся в процессе дыхания.<sup>[11]</sup>

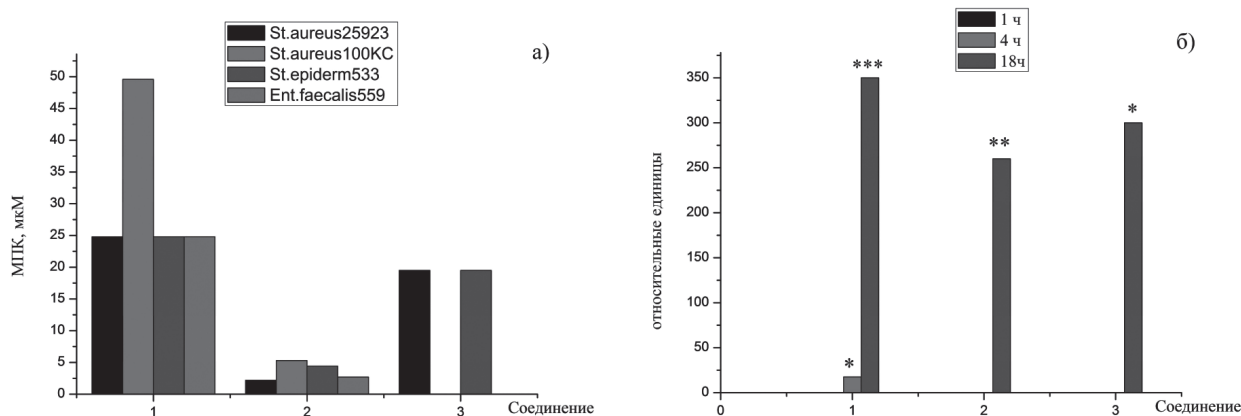
## Экспериментальная часть

Аминокислотные производные гемина **1**, **2**, **3** синтезированы в соответствии с ранее описанными методиками.<sup>[8]</sup>

Измерение степени окислительного стресса проводилось как описано в<sup>[11]</sup>, с использованием Lux-биосенсора, любезно предоставленного его разработчиками. Пробы по 200 мкл бактериальной культуры *E. coli K-12* с концентрацией  $1 \cdot 10^7$  кл/мл переносили в специальные кюветы, одна из которых служила контролем (в неё добавляли 4 мкл дистиллированной воды), а в другие вносили по 4 мкл агентов в различной концентрации. Приготовленные таким образом пробы с клетками lux-биосенсора располагали перед фотоумножителем в люминометре LMA01 (Beckman, США) при комнатной температуре и через определённые интервалы измеряли интенсивность их биолюминесценции.

## Результаты и обсуждение

В результате выполненных исследований показано, что взаимодействие ПГ с живой бактерией *E. coli K-12* сопровождается накоплением пероксидов (Рисунок 2).



**Рисунок 2.** Сопоставление антимикробной активности (а) в отношении грамположительных бактерий и образования пероксида (б) при взаимодействии ПГ с Lux-биосенсором на основе *E. coli K-12*. 0 – Контроль (в отсутствие ПГ), \* – концентрация ПГ 0,5 мкМ; \*\* – концентрация ПГ 5 мкМ; \*\*\* – концентрация ПГ 50 мкМ.

При сравнении графиков, приведённых на Рисунках 2а и 2б, видна определенная корреляция между концентрациями ПГ, при которых наблюдалось выраженное накопление пероксида, и МПК. Так, для соединений **1**, **2** и **3** наблюдается значительное накопление пероксида в интервале концентраций от 0,5 мкМ до 50 мкМ, что соотносится с заметной антимикробной активностью данных ПГ, обладающих низкими значениями МПК.

Результаты в виде сигнала люминометра представлены в Таблице 1 в относительных единицах. Значимыми считались результаты, отличающиеся от контроля в 2 и более раз. Видно, что при воздействии ПГ на биосенсор в течение 4 ч больших эффектов не наблюдается. Однако через 18 ч содержание пероксида становится значительным и превышает  $1 \cdot 10^{-3}$  М, в ряде случаев даже при субмикромольных концентрациях.

Из полученных данных следует, что взаимодействие ПГ с мембраной *E. coli* включает элементы окислительного механизма. Для подтверждения полученных данных был проведён эксперимент, заключающийся в проверке возможного повышения уровня люминесценции в отсутствие микроорганизма, а именно в смеси, содержащий перекись водорода, ПГ и люминол. Оказалось, что в присутствии ПГ концентрация пероксида снижается, что находится в соответствии с полученными нами ранее данными. Как было показано в предыдущих работах,<sup>[6]</sup> производные гемина способны разлагать пероксид.

Для ответа на вопрос о природе генерируемого пероксида, межклеточную жидкость отделяли от биосенсора и определяли в ней наличие пероксида путём добавления люминола. Отрицательный результат данного тестирования может указывать на отсутствие перекиси водорода в растворе и наличие алкилпероксида. Возможно, он образуется в липидной внешней мембране бактерии вследствие внедрения в неё ПГ. Известно, что клеточная стенка может действовать как «губка» для адсорбции и абсорбции порфирина, давая тем самым ложноположительную реакцию, свидетельствующую о поглощении порфирина, но не приводящую к гибели микроорганизма.<sup>[12]</sup>

Таблица 1. Повышение содержания пероксида в растворе ПГ в присутствии биосенсора на основе *E. coli* K-12.

Вещество	Концентрация	Сигнал люминометра (относительные единицы)		
		1 ч	4 ч	18 ч
$K_{\text{среднее}}$		15,6	7,9	4,3
$K + H_2O_2 10^{-3} M$		200	92	143
$K + H_2O_2 10^{-4} M$		110	35	88
$K + H_2O_2 10^{-5} M$		60	29	20
<b>1</b>	50 мкМ	16	11,5	350
	0,5 мкМ	20	17,5	8,2
<b>2</b>	5 мкМ	17	13,3	260
	50 мкМ	15	11,5	300
<b>3</b>	0,5 мкМ	14	9,8	300

## Заключение

Таким образом, с использованием Lux-биосенсора в ходе прямого эксперимента было подтверждено наличие окислительного стресса как возможного элемента антибактериального действия ПГ при взаимодействии с живой бактерией, что находится в соответствии с выявленной нами ранее физико-химическими методами каталитической активностью ПГ при окислении органических субстратов.

**Благодарность.** Авторы выражают глубокую благодарность разработчикам Lux-биосенсора – Завильгельскому Г.Б., Манухову И.В., Котовой В.Ю. – за предоставление последнего для осуществления настоящей работы.

## Список литературы

### References

- Galluzzi L., Karp. M. *Comb. Chem. High Throughput Screen* **2006**, *9*, 501-514.
- Gu M.B., Mitchell R.J., Kim B.C. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **2004**, *87*, 268-305.
- Vollmer C.A., Van Dyk T.K. *Adv. Microb. Physiol.* **2004**, *49*, 131-174.
- Zavilgelsky G.B., Kotova V.Yu., Manukhov I.V. *Mutation Research* **2007**, *634*(1-2), 172-176.
- Zavilgelsky G.B., Kotova V.Yu., Manukhov I.V. *Rossiiskie Nanotekhnologii* **2011**, *6*(5-6), 401-405 (in Russ.).
- Evstigneeva R.P., Zheltuhina G.A., Rozhkova E.A. *Kinetika i Kataliz* **1999**, *40*, 256-260 (in Russ.).
- Roginsky V.Z., Zheltukhina G.A., Nebolsin V.E. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 6798-6806.
- Zheltukhina G.A., Lobanova T.N., Nebol'sin V.E., Galljamov M.O., Dranicyna S.M., Kostanjan I.A. *Russ. J. Bioorg. Chem.* **2006**, *32*, 179-190.
- Okorochenkov S.A., Zheltukhina G.A., Roginsky V.A., Nossik N.N., Zheltukhin S.L., Nebolsin V.E. *J. Porphyrins Phthalocyanines* **2012**, *16*, 297-309.
- Okorochenkov S.A., Zheltuhina G.A., Mirchink E.P., Feofanov A.V., Nebol'sin V.E. In: *6th Moscow International Congress "Biotechnology: State and Prospects"* **2011**, p. 86-87 (in Russ.).
- Kotova V.Ju., Manuhov I.V., Zavil'gel'skij G.B. *Biotehnologiya* **2009**, *6*, 16-25 (in Russ.).
- Malik Z., Hanania J., Nitzan Y. *J. Photochem. Photobiol. B.* **1990**, *5*, 281-293

Received 22.02.2013

Accepted 28.04.2013