



БАКТЕРИАЛЬНЫЙ ПИГМЕНТ ПРОДИГИОЗИН И ЕГО ГЕНОТОКСИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

© 2013 г. И. Д. Гурьянов^{*, #}, Н. С. Карамова^{**}, Д. В. Юсупова^{**},
О. И. Гнездилов^{***}, Л. А. Кошкарова^{**}

*Казанский национальный исследовательский технологический университет
420015, Казань, ул. К. Маркса, 68

**Казанский (приволжский) федеральный университет, Казань

***Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра РАН, Казань

Поступила в редакцию 11.01.2012 г. Принята к печати 31.01.2012 г.

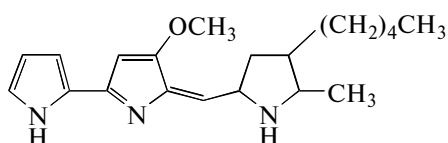
Из биомассы бактерий *Serratia marcescens* ATCC 9986 выделен пигментный комплекс, который с применением хроматографических методов разделен на отдельные фракции. Анализ фракций спектрофотометрическим методом, тонкослойной хроматографией, ЯМР- и масс-спектрометрией позволил выделить из комплекса так называемую “красную фракцию”, подтвердить идентичность продукта красной фракции пигменту продигиозину и доказать его чистоту. Установлены особенности токсического действия продигиозина. Впервые определена возможность индукции пигментом мутаций в клетках *Salmonella typhimurium* TA 100 (тест Эймса) и хромосомных повреждений эритробластов млекопитающих.

Ключевые слова: *Serratia marcescens* ATCC 9986, продигиозин, токсическое и генотоксическое действие.

DOI: 10.7868/S0132342312060048

ВВЕДЕНИЕ

Ярко-красный пигмент продигиозин, синтезируемый энтеробактериями *Serratia marcescens*, представляет собой линейный трипиррол (пиррол, 3-метоксипиррол, 2-метил-3-амилпиррол) [1].



Как и многие вторичные метаболиты бактерий, продигиозин в последнее время приобретает практическое значение: он применяется в промышленности как краситель для полимеров [2], разработан способ использования продигиозина в качестве маркера нефтепродуктов [3]. Продигиозин и продигиозинподобные пигменты, синтезируемые некоторыми видами микроорганизмов, рассматриваются как новое семейство противоопухолевых лекарственных препаратов [4, 5]. Про-

дигиозин действует также как иммунодепрессант, селективно блокируя пролиферацию Т-клеток киллеров [6].

В связи с использованием продигиозина в фармацевтике (Sigma-Aldrich, CAS Number: 56144-17-3) возникает необходимость изучения его генотоксических свойств.

Целью данной работы являлось получение высокоочищенного препарата продигиозина и исследование его генотоксических и токсических свойств.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что в кислой и нейтральной средах продигиозин имеет красную окраску, с резко выраженным спектральным максимумом поглощения при длине волны 535–540 нм. В щелочной среде пигмент окрашивается в оранжево-желтый цвет; при этом его спектр поглощения характеризуется более широким пиком с максимумом при длине волны 470 нм [1].

Неочищенный пигментный комплекс (НПК), растворенный в этаноле, имел типичный для продигиозина спектр поглощения в видимой области в кислых и щелочных условиях (рис. 1). На колон-

Сокращения: НПК – неочищенный пигментный комплекс; НХЭ – нормохромные эритроциты; ПХЭ – полихромные эритроциты.

Автор для связи (тел.: (843) 515-32-00; эл. почта: igurjano.27@mail.ru).

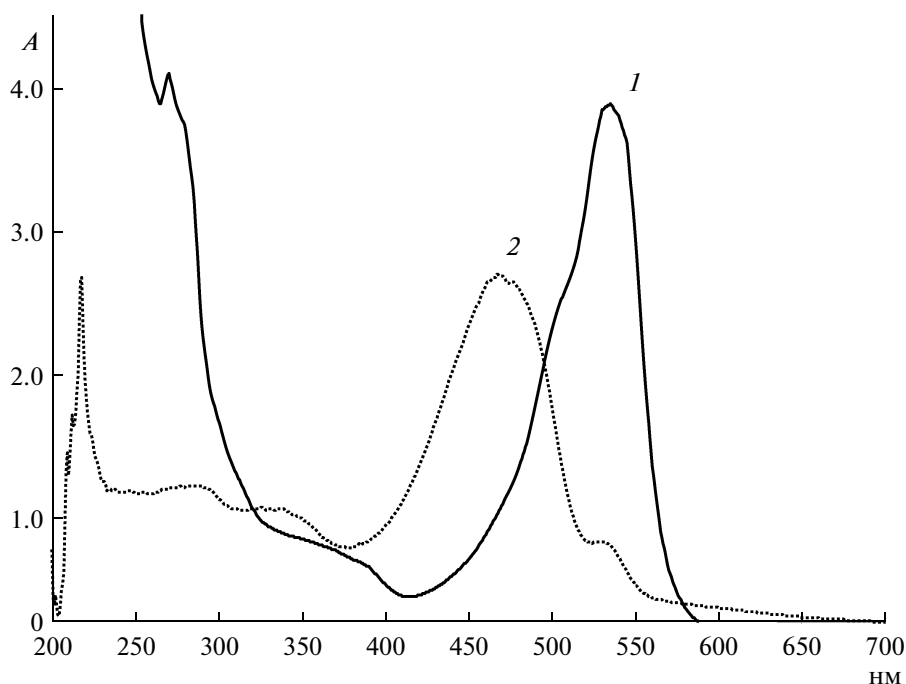


Рис. 1. Оптические спектры поглощения неочищенного пигментного препарата в этаноле при pH 3.0 (1) и pH 9.0 (2).

ке с силикагелем данный комплекс делился на три основные фракции: желто-оранжевую, красную и сиреневую, оптические спектры поглощения которых представлены на рис. 2.

Таблица 1. Данные ЯМР-спектров (δ , м.д.) продигиозина, полученные в данной работе и представленные в литературе

Пигмент <i>M</i> 323.5 Да [7]	Пигмент <i>M</i> 323 Да [8]	Пигмент <i>M</i> 322.9 Да Данное исследование
12.44	—	—
12.54	—	—
—	—	7.55
7.23	7.26	7.27
6.95	6.99	6.99
6.92	6.95	—
6.69	6.71	6.68
6.35	6.39	6.35
6.08	6.11	6.08
4.01	4.04	4.00
2.76	2.58	2.55
2.39	2.44	2.40
1.53	1.59	1.60
1.30	1.34	1.33
1.32	1.31	1.31
0.89	0.93	0.92

Для проведения дальнейшей очистки с использованием препаративной ТСХ была отобрана красная фракция, которая на пластинках с силикагелем также разделялась на три вышеуказанные фракции (сиреневая — R_f 0.058, красная — R_f 0.312, желто-оранжевая — R_f 0.824; элюент — гексан-этиловый эфир-уксусная кислота, 70 : 30 : 1).

Согласно результатам спектрофотометрии, красная фракция пигментного комплекса наиболее соответствовала продигиозину. Она была выделена методом препаративной ТСХ и проанализирована с использованием методов ТСХ, масс-спектрометрии (рис. 3) и ЯМР-спектроскопии (рис. 4). Молекулярная масса выделенной красной фракции, определенная методом масс-спектрометрии, составила величину 322.9 Да, что соответствует молекулярной массе продигиозина ($C_{20}H_{25}N_3O$) [1, 4]. Сопоставление сигналов ЯМР-спектра продукта красной фракции с таковыми для продигиозина, представленными в литературе [7, 8], указывает на его соответствие данному пигменту (табл. 1).

Проявление хроматограмм НПК и его красной фракции после опрыскивания раствором нингидрина, реактивом Драгендорфа, раствором роданина *B* и экспозиции в йодной камере показало наличие фосфатидов, и в частности аминокосфатидов, в НПК и их отсутствие в пигментном образце (красной фракции), прошедшем все этапы очистки.

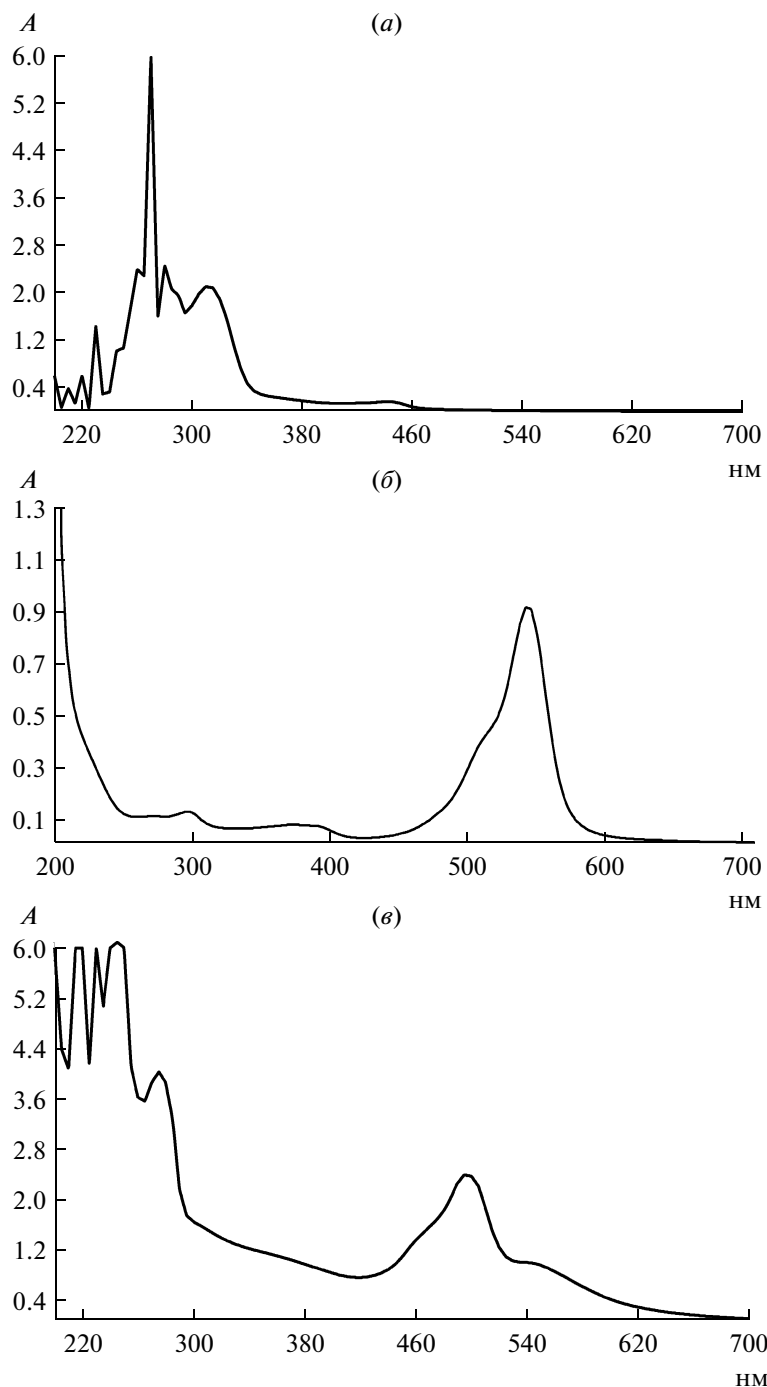


Рис. 2. Оптические спектры поглощения фракций, полученных при хроматографии неочищенного пигментного препарата на колонке: желто-оранжевой (а), красной, с максимумом поглощения 535 нм и плечом 485–515 нм (б), сиреневой, с максимумом поглощения 488–500 нм (в).

Таким образом, с применением методов колоночной и тонкослойной хроматографии мы получили высокоочищенный препарат продигиозина, чистота которого была подтверждена методами ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии.

Токсический эффект продигиозина определяли по выживанию обработанного им тестерного

штамма *S. typhimurium* TA 100 в опытных вариантах по сравнению с контрольным (в отсутствие продигиозина). Продигиозин обладал сильным токсическим действием по отношению к тестерному штамму в концентрациях 1.0 мкг/мл и выше. Эти данные были учтены при изучении генотоксичности продигиозина.

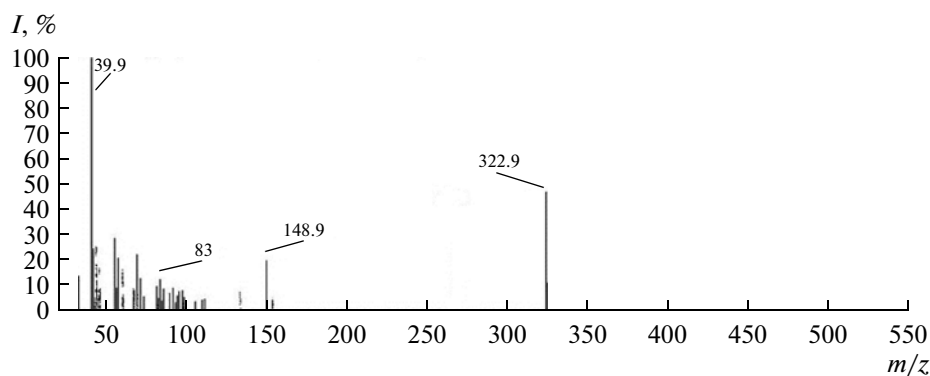


Рис. 3. Масс-спектр красной фракции пигмента.

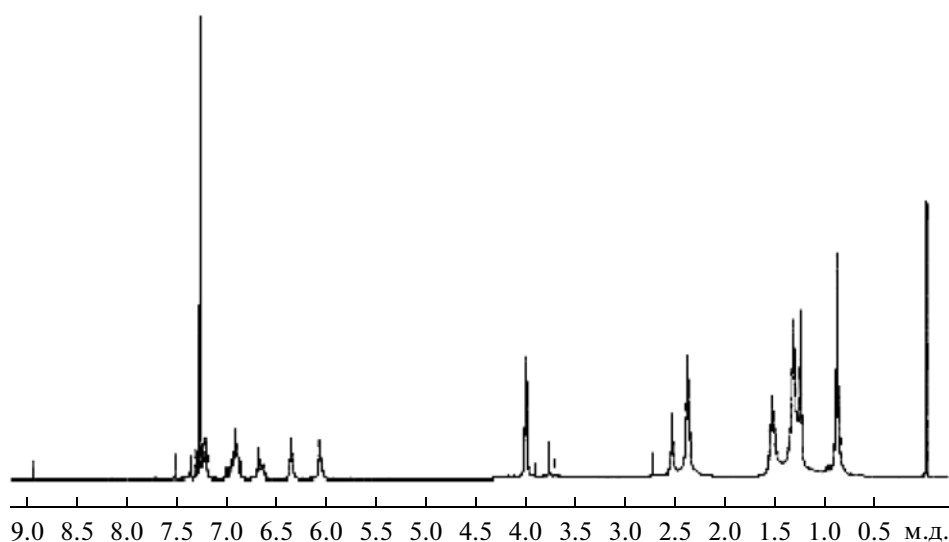


Рис. 4. ЯМР-спектр очищенного пигментного препарата, δ , м.д.: 0.92, 1.31, 1.33, 1.60, 2.40, 2.55, 4.00, 6.08, 6.35, 6.68, 6.99, 7.27, 7.55.

Мутагенность продигозина оценивали по превышению количества колоний-ревертантов в опыте (с добавлением исследуемого соединения) над контролем (без внесения исследуемого соединения). Сущность теста Эймса заключается в том, что тестерные штаммы бактерий *S. typhimurium* культивируют на специальной среде, на которой могут расти лишь мутанты этих штаммов, у которых произошла мутация от ауксотрофности по гистидину к прототрофности. Без внешних воздействий такие мутации происходят с низкой частотой. Если в среду культивирования ввести химический мутаген, то частота мутаций значительно увеличивается, что регистрируется по числу колоний. Для выявления возможных трансформаций мутагена в организме млекопитающих использовали метаболическую активацию с при-

менением микросомной фракции печени S9. Учет результатов проводили по индукции обратных мутаций к гистидиновой прототрофности через 48 ч инкубации, сравнивая число колоний-ревертантов в опыте и контроле. Использовали следующую систему оценки соединений на мутагенную активность: если число колоний-ревертантов в опыте и контроле достоверно различалось менее чем в 2.5 раза, то делали заключение об отсутствии мутагенной активности; если фиксировали превышение от 2.5 до 10 раз, то делали заключение о наличии мутагенной активности. Превышение от 10 до 100 раз свидетельствовало о средней мутагенной активности исследуемого соединения. Если фиксировали превышение более чем в 100 раз, — вещество обладает сильной мутагенной активностью [9].

Таблица 2. Мутагенное действие НПК и чистого продигиозина в различных концентрациях в тесте Эймса

Концентрация НПК/продигиозина, мкг/мл среды	Число колоний-ревертантов			
	С метаболической активацией		Без метаболической активации	
	Чистый продигиозин	НПК	Чистый продигиозин	НПК
0	11 ± 1.7		6 ± 0.6	
0.05	13.2 ± 1.8	33.75 ± 3.1	8.4 ± 0.9	18.0 ± 2.1
0.1	16.0 ± 2.1	45.32 ± 4.3	7.3 ± 0.76	27.0 ± 3.2
0.5	13.0 ± 1.9	53.17 ± 5.2	5.8 ± 0.58	34.5 ± 4.3
NaN ₃ *	206 ± 8.0		98.6 ± 7.5	

* NaN₃ использовали в качестве позитивного контроля в концентрации 10 мкг/чашку.

Для НПК в тесте Эймса без метаболической активации превышение колоний-ревертантов в опыте над контролем составило 5.25, 4.5 и 3.0 раза при концентрации продигиозина 0.5, 0.1 и 0.05 мкг/мл соответственно. В варианте опыта с метаболической активацией количество ревертантов на среде с 0.5, 0.1 и 0.05 мкг/мл НПК превышало контрольный уровень в 4.8, 4.12 и 3.1 раза соответственно (табл. 2). Обнаруженный эффект носит дозозависимый характер, однако он незначителен и свидетельствует о слабой мутагенной активности соединения [9].

Мутагенный эффект чистого продигиозина снижался до уровня фоновой частоты реверсий в негативном контроле, то есть проявляемый генотоксический потенциал НПК, вероятно, связан с загрязняющими компонентами, присутствующими в НПК, способными вызывать реверсию микроорганизмов опытного штамма к прототрофности.

Метаболическая активация пигментных препаратов при использовании фракции S9 не приводила к усилению мутагенного эффекта в тесте Эймса. Возможно, система монооксигеназ фракции S9 не способна трансформировать такое соединение, как продигиозин, либо интермедиаты, образующиеся при его метаболизме, не отличаются по степени своей генотоксичности от исходного соединения. Таким образом, тест Эймса показал слабую мутагенную активность чистого продигиозина в ряду концентраций 0.5–0.1–0.05 мкг/мл. Очищенный продигиозин не проявил мутагенной активности во всех вариантах опыта (табл. 2).

Наиболее распространенным методом изучения генотоксического потенциала соединений *in vivo* является учет количества микроядер в полихромных эритроцитах периферической крови мышей. Анализ 1350 эритроцитов в контрольных образцах препаратов крови мышей и опытных вариантах с различными дозами чистого продигиозина, введенного испытываемым мышам подкожно, проводили с целью установления отношения нормохромных эритроцитов (НХЭ) к полихромным (ПХЭ), которое отражает уровень хромосомных повреждений и генотоксический потенциал исследуемых соединений. Частота встречаемости ПХЭ в контрольных образцах через 48 ч проведения опыта была равна 0.43 ± 0.14 %, что несколько выше приведенных в литературе значений (0.2–0.3%) [10, 11]. Результаты анализа влияния опыт-

Таблица 3. Влияние продигиозина на частоту образования ПХЭ (%) в периферической крови мышей

Концентрация, мкг/кг веса животного	Частота образования ПХЭ, %	
	48 ч	72 ч
0 (негатив. контроль)	0.43 ± 0.14	0.41 ± 0.16
4	0.50 ± 0.17	0.49 ± 0.11
8	0.47 ± 0.13	0.54 ± 0.13
25	0.37 ± 0.09	0.27 ± 0.11
125 (колхицин)*	1.14 ± 0.08	1.65 ± 0.07

* Колхицин использовали в качестве позитивного контроля.

ных концентраций очищенного продигиозина на частоту образования ПХЭ представлены в табл. 3.

Проведенное изучение генотоксичности продигиозина с использованием микроядерного теста показало незначительную индукцию микроядер в ПХЭ у обработанных животных при всех используемых концентрациях продигиозина и отсутствие дозозависимости эффекта. В результате работы впервые показано отсутствие генотоксического воздействия очищенного продигиозина в тесте Эймса и микроядерном тесте *in vivo*.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали пигментобразующий штамм *S. marcescens* ATCC 9986, полученный из коллекции культур института микробиологии АН Армении. В тесте Эймса использовали мутантный штамм *Salmonella typhimurium* TA100 – his G46, rfa, uvr, bio, pKM101, полученный из коллекции культур БИСХ, г. Купавна.

Использовали следующие питательные среды и растворы (г/л дистиллированной воды): пептон-глицериновая среда [12]: пептон – 5, глицерин – 20, агар – 20, рН 7.6; L-бульон: дрожжевой экстракт – 5, пептон – 10, NaCl – 5; 0.6% L-агар: дрожжевой экстракт – 5, пептон – 10, NaCl – 5, агар – 6; 2%-й L-агар: дрожжевой экстракт – 5, пептон – 10, NaCl – 5, агар – 20; 0.6%-й верхний агар (ВА): агар (Вастоагар “Typ USA”) – 0.6 г; NaCl – 0.6 г, дистиллированная вода до 100 мл. Непосредственно перед опытом на каждые 80 мл ВА добавляли 10 мл 0.5 мкМ раствора L-гистидина солянокислого и 10 мл 0.25 мкМ раствора биотина. Нижний агар (НА): 2% голодный агар (рН 7.4) – 300 мл, 20% раствор глюкозы – 10 мл, солевой концентрат – 100 мл, 1 % раствор MgSO₄ – 2 мл. Голодный агар: агар (Вастоагар “Typ USA”) – 20 г/л. Солевой концентрат (г/л): цитрат Na трехзамещенный – 2, K₂HPO₄ · 3H₂O – 42, KH₂PO₄ – 18, (NH₄)₂SO₄ – 4.

В тесте Эймса [9; 14] использовали лиофилизированные микросомные (S9) фракции печени крыс (получены из Института экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения РАН, г. Пермь).

Для получения пигмента продигиозина штамм-продуцент *S. marcescens* ATCC 9986 культивировали на агаризованной пептоно-глицериновой среде. Экстракцию продигиозина из биомассы бактерий проводили подкисленным этанолом (100 мл 96% этилового спирта + 1 мл HCl_{конц}; 10 мл/г биомассы) до полного обесцвечивания биомассы. Полученный препарат высушивали на воздухе и повторно экстрагировали. Процедуру

повторяли несколько раз до освобождения от нерастворимых примесей. Полученный однородный раствор был обозначен как неочищенный пигментный комплекс (НПК), или этанольный экстракт.

Этанольный экстракт выпаривали досуха в сушильном шкафу при температуре 45–50°C и перерастворяли остаток в хлороформе (10 мл/г осадка). Полученный раствор смешивали с равным объемом водно-этанольной смеси (4 : 1), и эмульгировали на магнитной мешалке в течение 1 ч при комнатной температуре. Водно-этанольную смесь, содержащую водорастворимые примеси, отделяли с помощью делительной воронки. Процедуру повторяли, увеличив объемное содержание этанола вдвое. Затем пигментный препарат повторно высушивали в вакуумном шкафу и перерастворяли в этаноле (10 мл/г осадка).

Жидкостную хроматографию проводили на стеклянной колонке общим объемом 628 см³ с использованием силикагеля марки КСК. Однородную суспензию сорбента готовили из расчета 5.0 г силикагеля на 20–30 мл смеси гексан–ацетон, 9 : 1. После наполнения колонки уровень растворителя опускали до верхней границы столбика силикагеля и дважды промывали смесью гексан–ацетон, 3 : 1. Растворенный в этаноле препарат после экстракций наносили на поверхность сорбента. Вещества с колонки элюировали последовательно 350 мл смеси гексан–ацетон, 3 : 1, и затем 200 мл ацетона. Скорость движения подвижной фазы в колонке 0.03 мл/сек.

Препаративную ТСХ проводили на стеклянных пластинках с силикагелем марки 60 F₂₅₄ “Merck” (Германия) в хроматографической системе гексан–этиловый эфир–уксусная кислота, 70 : 30 : 1. Отдельные полосы соскабливали с пластин и вещества последовательно элюировали с силикагеля следующими растворителями: 96% этанол, ацетон, хлороформ. Затем их анализировали с использованием реактивов для определения фосфолипидов: 0.5% раствор родамина В в этаноле, реактив Драгендорфа, нингидрин, пары йода [13]. Каждый этап очистки завершали анализом оптических спектров поглощения полученных фракций в ультрафиолетовой и видимой областях спектра.

Для характеристики очищенного пигмента продигиозина анализировали его ЯМР-спектр на ядрах ¹H (спектрометр “Bruker Avance II” (Германия), 500 МГц), с использованием в качестве растворителя дейтерированного хлороформа (CDCl₃). Масс-спектрометрию проводили на приборе ВПМС МХ-5303 “ИАП РАН” (Россия).

Тест на токсичность по отношению к *S. typhimurium* осуществляли согласно методу [10]. Полуколичественный учет генных мутаций (тест Эймса) [14] проводили по стандартной процедуре. Результаты оценивали по индукции обратных мутаций в клетках *S. typhimurium* TA 100 к гистибиновой прототрофности через 48 ч инкубации в присутствии продигиозина и без него (негативный контроль). Сравнивали число колоний-ревертантов в опыте и контроле. В качестве позитивного контроля использовали азид натрия в концентрации 10 мкг/чашку.

Микроядерный тест in vivo заключается в выявлении и количественной оценке потенциальной цитогенетической активности исследуемого соединения на эритроцитах периферической крови мышей. Метод основан на микроскопической регистрации клеток с микроядрами – ПХЭ. Спонтанная частота возникновения таких клеток составляет 0.2–0.3%. Продигиозин в опытных концентрациях 25.0, 8.0 и 4.0 мкг/кг вводили мышам подкожно. Образцы крови из хвостовой вены животного отбирали через 48 и 72 ч после введения исследуемых концентраций. Препараты окрашивали красителем Романовского–Гимза в течение 30–40 мин и анализировали с использованием световой микроскопии. Определяли число клеток, содержащих микроядра, по отношению к общему количеству эритроцитов. В качестве негативного контроля использовали 10% раствор этанола. Позитивным контролем (индуктором образования микроядер) служил колхицин в концентрации 125 мкг/кг веса мыши, растворенный в 10% растворе этанола.

Количество пигмента и концентрацию его растворов рассчитывали с использованием удельного коэффициента поглощения, который при длине волны 535 нм составляет величину 51.5×10^3 л/г см [15]. Измерения проводили на спектрофотометре Lambda 35, “Perkin Elmer instruments” (США), спектры анализировали с использованием программного обеспечения UV Winlab, версия 2.85. Для анализа полученный спиртовой экстракт очищенного пигмента разводили подкисленным этанолом (9 мл этанола + 1 мл 1М HCl).

Статистическая обработка результатов. Математическую обработку данных проводили в стандартной компьютерной программе “Microsoft Excel”. Группу данных считали однородной, если среднеквадратическое отклонение σ в группе не превышало 13%. Различия между группами считали достоверными при критерии вероятности $p \leq 0.05$.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Феофилова Е.П.* Пигменты микроорганизмов. М.: Наука, 1974. 218 с.
2. *Габутдинов М.С., Рязанцева И.Н., Черевин И.Ф., Медведева Ч.Б., Валеева Н.Н., Куликова О.В., Андреева И.Н., Огородникова Т.И.* Полимерная красящая композиция-концентрат // Патент РФ. № 2129136, по заявке № 97106747, Приоритет от 23.04.97.
3. *Гарейшина А.З., Петухова Е.В., Юсупова Д.В., Лебедев Н.А., Чертилина Т.Н., Пономарева А.З.* Композиция, включающая нефтепродукт и маркер, способ и раствор для маркирования нефтепродукта, способ идентификации нефтепродукта и способ получения маркера // Патент РФ. № 2218381, C10L1/00, C10M159/02, C10N30 : 20, Приоритет от 22.07.02. – 2003. Бюл. № 34.
4. *Montaner B., Navarro S., Piqué M., Viaseca M., Marti-nell M., Giralt E.* // J. Pharmacol. 2000. V. 131. P. 585–593.
5. *Llagostera, E., Soto-Cerrato V., Joshi R., Montaner B., Gimenez Bonafe R., Perez-Tomas R.* // Anticancer Drugs. 2005. V. 16. P. 393–399.
6. *Azuma T., Watanabe N., Jagisawa H., Iwamura M., Kobayashi J.* // Immunopharmacology. 2000. V. 46. P. 29–37.
7. *Alihosseini F., Lango J., Ju K.-S., Hammock B.D., Sun G.* // J. Biotechnol Prog. 2010. V. 26. P. 352–360.
8. *Song M.-J., Bae J., Lee D.-S., Kim C.-H., Kim J.-S., Kim S.-W., Hong Suk-In* // J. Biosci. & Bioengin. Japan. 2006. V. 101. № 2. P. 157–161.
9. *Фонштейн Л.М., Абилев С.К., Бобринев Е.В.* Методы первичного выявления генетической активности загрязнителей среды с помощью бактериальных тест-систем // Методические указания. М., 1985. 34 с.
10. *Ильинская О.Н., Маргулис А.Б.* Краткосрочные тест-системы для определения генотоксичности // Методическое руководство. Казань: Изд-во Казан. ун-та, 2005. 31 с.
11. *Heddle J.A., Cimino M.C., Hayashi M., Romagna F., Shelby M.D., Tucker J.D., Vanparys P., MacGregor J.T.* // Environ. Mol. Mutagen. 1991. V. 18. P. 277–291.
12. *Katz D.S., Sobleski R.J.* // J. Clin. Microbiol. 1979. V. 9. P. 301–303.
13. Хроматография в тонких слоях / Ред. Э. Шталь, пер. с нем. Яновского М.И. М.: Мир, 1965. 508 с. Dünnschicht-Chromatographie ein Laboratoriumshand-buch / Bearbeitet von Bolliger H.R., Brenner M., Gän-shirt H., Mangold H.K., Seiler H., Stahl E., Waldi D., Herausgegeben von Egon Stahl / Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg, 1962.
14. *Ames B.N., Lee F.D.* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1973. V. 70. P. 782.
15. *Williams R.P., Gott C.L., Hussain Qadri S.M., Scott R.H.* // J. Bacteriol. 1971. V. 106. № 2. P. 438–443.

Bacterial Pigment Prodigiosin and Its Genotoxic Effects

I. D. Guryanov*, N. S. Karamova**, D. V. Yusupova**, O. I. Gnezdilov***, L. A. Koshkarova**

*Kazan State Technological University, ul. K. Marksa 68, Kazan, 420015 Russia

**Kazan (Volga region) Federal University

***Kazan institution of biochemistry and biophysics of Kazan scientific centre of Russian Academy of Science

The prodigiosin preparation was isolated and purified from *Serratia marcescens* ATCC 9986, using chromatographic methods. The analysis of the preparation by TLC, NMR-spectrometry and mass-spectrometry allowed to confirm the red pigment fraction as the prodigiosin and detect its purity. Originally, the specific features of the toxic and genotoxic effects of prodigiosin and the possibility of induction of mutations by pigment in the cells of *Salmonella typhimurium* TA 100 (Ames test) and chromosome damage of mammalian erythroblasts have been determined.

Keywords: Serratia marcescens ATCC 9986, prodigiosin, toxic and genotoxic action