

Raport/Studiu

Utilizarea de assay-uri specifice pentru cuantificarea stresului oxidativ în vederea elaborării unor noi strategii antimicrobiene

efectuat în cadrul proiectului *Abordarea bioeconomică a
agenților antimicrobieni – utilizare și rezistență*

(cod - PN-III-P1-1.2-PCCDI-2017-0361).

Colectiv de redacție:

Coordonatori: Prof. dr. Gabriela Tănăsie, Prof. dr. Carmen Panaitescu

Membri: Conf. Dr. Carmen Tatu, Doctorand Gaspar Cristina

Data finalizării: 15.11.2020

Acknowledgements

Activities under this work were carried out in the *Oncogen Research Center* - financed by project *"A bio-economical approach of the antimicrobial agents - use and resistance"*, in the frame of contract PCCDI 7/19.03.2018, code: PN-III P1-1.2-FPRD-2017.

1. Introducere

Pentru a putea elabora o strategie eficientă antimicrobiană utilizând teste care să cuantifice stresul oxidativ, este necesară înțelegerea mecanismelor prin care acesta acționează.

STRESUL OXIDATIV este definit ca situația în care se produce un dezechilibru între producția de **specii reactive ale oxigenului (SRO)** respectiv **specii reactive ale azotului (SRN)** și **apărarea antioxidantă**.

Speciile reactive ale oxigenului sunt produse de organismele vii ca urmare a metabolismului celular normal și a factorilor de mediu, cum ar fi poluanții atmosferici sau fumul de țigară. La concentrații mici până la moderate, acestea funcționează în procesele celulare fiziologice, dar la concentrații mari sunt capabile să deterioreze structuri celulare cum ar fi: carbohidrații, acizii nucleici, lipidele, proteinele și în plus, pot modifica funcțiile lor. Organismele aerobe și-au dezvoltat două sisteme de control a speciilor reactive ale oxigenului: primul și cel mai important - prevenirea formării lor și cel de-al doilea - neutralizarea imediat ce aceștia se formează.

Sistemele integrate antioxidante, includ antioxidanți enzimatici și neenzimatici care sunt, de obicei, eficienți în blocarea efectelor nocive ale SRO, dar în anumite condiții echilibrul dintre oxidanți și antioxidanți se dereglează în favoarea oxidanților. Stresul oxidativ definește tocmai instalarea acestui dezechilibru (Birben E. et.al., 2012). Chiar dacă SRO reprezintă sisteme de apărare ale celulei în fața invaziei microbiene, s-a dovedit faptul că aproape toate bacteriile au evoluat și sunt capabile să folosească un arsenal de antioxidanți adaptivi și inductibili, astfel încât pot gestiona efectele toxice ale SRO (Kim S. et. al., 2019). S-a dovedit faptul că celulele bacteriene au o serie de proteine care reușesc să repare proteinele oxidate rezultate în urma atacului SRO (Ezraty B., et. al., 2017).

Speciile reactive ale oxigenului (SRO) reprezintă specii chimice care posedă un electron impar. Fiind fragmente moleculare foarte reactive, radicalii liberi reacționează cu moleculele organice, macromoleculele și membranele, perturbând homeostazia intracelulară și deteriorând structurile subcelulare (mitocondriile și reticulul endoplasmic) iar produșii lor de descompunere intră în structura pigmentilor lipofuscini, denumiți și pigmenti de uzură (wear and tear pigments) sau pigmenti de îmbătrânire (age pigments). Ei sunt produși în celulă în timpul fagocitozei sau accidental. SRO apar în anumite reacții de oxido-reducere în care au loc modificări de pe urma cărora substanța respectivă își schimbă adesea funcția biologică (devine mai hidrosolubilă sau intervine în alt lanț de reacții metabolice). SRO intervin ca principal factor de amplificare în producerea "leziunilor oxidative": peroxizi, hidroperoxizi, endoperoxizi și epoxizi, la care se cumulează o nouă amplificare rezultată din dezechilibrarea balanței: prin exces de pro-oxidanți, dublat de deficit de anti-oxidanți.

R. 2.5.3 Utilizarea de assay-uri specifice pentru cuantificarea stresului oxidativ în vederea elaborării unor strategii antimicrobiene

Amplificarea și acumularea în timp a atacului radicalilor liberi și stresului oxidativ (stres cronic), exprimată prin dezechilibrarea raportului exces pro-oxidanți/deficit antioxidanți, provoacă dezechilibrarea balanței anabolism/catabolism în direcția stres anabolic (hipo-anabolism)/stres catabolic (hiper-catabolism) cu acumulare intracelulară de deșeuri insolubile. Deteriorarea oxidativă poate avea un efect devastator asupra structurii și activității proteinelor și poate duce chiar la moartea celulară. Aminoacizii care conțin sulf cisteină și metionină sunt deosebit de sensibili la speciile reactive de oxigen și speciile reactive de clor, care pot deteriora proteinele (Ezraty B., et. al., 2017).

Tipuri de SRO produse *in vivo*:

1) Radicalul hidroxil - OH[•] este unul din cei mai reactivi radicali liberi, apare prin expunerea organismului la radiații ionizante. Poate reacționa cu aproape toate moleculele din celula vie; odată format distruge tot ce se găsește în jur, dar nu poate migra pe distanțe mari în celulă. Aproape toate efectele de distrugere determinate de expunerea în exces la radiații ionizante, sunt inițiate de atacul radicalului hidroxil asupra proteinelor, carbohidraților, ADN-ului, lipidelor (Katerji M. et. al., 2019).

2) Anionul superoxid - O₂^{•-} este produs de fagocite (neutrofil, eozinofil, monocit, macrofag), precum și de alte celule ca: limfocite, fibroblaste, celule endoteliale vasculare în scopul inactivării virusurilor și bacteriilor. O₂^{•-} se consideră a fi implicat în transmiterea semnalului intracelular precum și în reglarea creșterii celulare.

Anionul superoxid, la fel ca și peroxidul de hidrogen, poate fi generat prin reacții de autooxidare în care compuși cum ar fi catecolamine, tetrahidrofolat reacționează cu oxigenul formând superoxidul (Katerji M. et. al., 2019). Acesta va oxida alți compuși inițiind lanțuri de reacții cu formarea altor radicali liberi. Mecanismul intim de formare presupune adăugarea unui electron la oxigenul molecular. Acest proces este mediat de nicotin adenin dinucleotid fosfat [NAD(P)H] oxidază sau xantin oxidază sau de un sistem de transport de electroni mitocondriali. Situl principal pentru producerea anionului superoxid este reprezentat de mitocondrii, adică acea parte a celulei specializată în producerea de adenzin trifosfat. În mod normal, electronii sunt transferați prin lanțul de transport de electroni mitocondriali pentru reducerea oxigenului în apă, dar aproximativ 1 până la 3% din toți electronii se scurg din sistem și produc superoxid. NAD(P)H oxidaza se găsește în leucocite polimorfonucleare, monocite și macrofage.

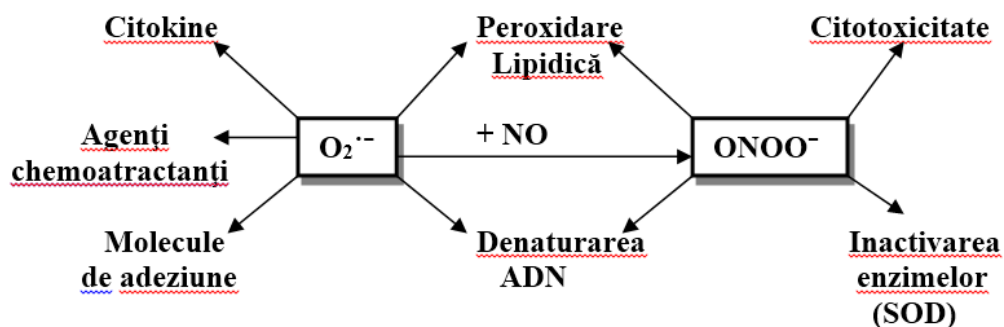


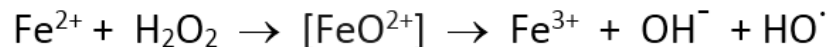
Figura 1 - Impactul biochimic al generării anionului superoxid (după Cuzzocrea S et. al., 2001)

R. 2.5.3 Utilizarea de assay-uri specifice pentru cuantificarea stresului oxidativ in vederea elaborarii unor strategii antimicrobiene

La fagocitoză, aceste celule produc o explozie de superoxid care duce la activitate bactericidă. Superoxidul este transformat în peroxid de hidrogen prin acțiunea superoxid dismutazei (SOD).

Anionul superoxid este capabil să producă o serie de deteriorări, incluzând: distrugerii la nivelul celulelor endoteliale cu creșterea permeabilității microvasculare, formare de agenți chemoatracanți ca leucotriena B₄, recrutare de neutrofile în vederea inflamației, peroxidare lipidică, distrugerea AND și formarea anionului peroxinitrit (ONOO⁻) care la rândul lui determină o serie de modificări așa cum reiese din figura 1 (Cuzzocrea S et. al., 2001).

3) Peroxidul de hidrogen (H₂O₂) apare în habitatele naturale prin reacții între sulf și oxigen la interfețele oxic/anoxic, prin reducerea fotochimică a oxigenului de către cromofori sau ciclul redox al pigmentilor. În plus, plantele și animalele pot excreta H₂O₂ pentru a distruge microbii (Seki M. et. al., 2004). H₂O₂ poate fi considerat o armă ideală deoarece este mic și neîncărcat electric. Aceste caracteristici îi facilitează traversarea pasivă a membranei celulare la viteze similare cu cele ale apei (Winterbourn CC et. al., 2006). Odată pătruns în interiorul citoplasmei, acesta perturbă metabolismul fierului, distugând practic celula. Pentru a identifica mecanismele prin care H₂O₂ prejudiciază supraviețuirea celulelor a fost folosit un model experimental care a utilizat bacteria Escherichia Coli. Rezultatele au arătat faptul că H₂O₂ exogen dăunează ADN-ului celulei și deci este mutagen. Acest efect este cunoscut ca și reacția Fenton, în care H₂O₂ reacționează cu fierul intracelular (Imlay JA et. al., 1988).



Explicația prin care H₂O₂ este atât de nociv pentru celule în momentul în care interferă cu metabolismul fierului, vine odată cu descoperirea faptului că acesta inactivează de fapt două familii de enzime care conțin fier: enzime mononucleare non-redox și dehidrataze [10, 11]. Practic, H₂O₂ oxidează fierul din aceste enzime și le suprimă activitatea. S-a observat că doar 0,5 μM H₂O₂ este suficient pentru a distruge celulele în această manieră. S-a observat că în urma reacției Fenton apar la nivelul celulei și o serie de leziuni care pot provoca mutagenză (Rai P. Et. al., 2001).

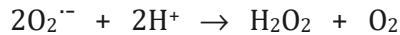
Sistemele protectoare antioxidante

Creșterea concentrației în O₂ a atmosferei terestre acum 3 miliarde de ani a obligat formele primitive ale vieții să se adapteze prin crearea de sisteme protectoare antioxidante. Aceste alge și bacterii unicelulare nu numai că s-au adaptat concentrației crescânde de O₂, dar au început să-l folosească ca promotor al evoluției vieții și inițiator al unor numeroase procese esențiale (Olinescu, 1994).

Organismul se apără împotriva excesului de radicali liberi cu ajutorul antioxidantilor neenzimatici (naturali și sintetici) sau enzimatici. Pentru a mări eficiența, pentru aceeași specie de radicali liberi acționează antioxidanți enzimatici și neenzimatici localizați în medii diferite membrană, citoplasmă, lichid extracelular și în mai multe fracțiuni subcelulare (Katerji M. et. al. 2019).

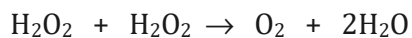
ANTIOXIDANȚI ENZIMATICI:

1) Superoxiddismutaza (SOD) - se găsește în orice celulă aerobă, în mitocondrie și citosol. Convertește anionul superoxid la peroxidul de hidrogen (Wei J. et al., 2001):



Există mai multe forme de SOD: Fe-SOD la organisme inferioare iar la organisme superioare în citoplasmă Cu-Zn-SOD și în mitocondrie Mn-SOD. Deși SOD se găsește destul de abundent în celulele mamiferelor, s-au observat boli în care activitatea enzimei este scăzută, fie datorită prezenței unor inhibitori, sau din cauza unei biosinteze micșorate. S-a constatat scăderea SOD în anumite focare: inflamațiile, tumorile, cataracta și în ischemiile unor organe mari (inimă, creier). S-a încercat introducerea SOD purificate în tratamentul unor boli cu rezultate variabile (Olanow CW, 1993). Rezultate remarcabile s-au obținut cu SOD sintetic, dar toxicitatea mare a acestui produs limitează utilizarea lui clinică.

2) Catalaza se găsește în toate celulele aerobe, în mitocondrii și peroxizomi. Acționează asupra moleculelor de peroxid de hidrogen, cu efect detoxifiant:



Cantitatea mare de catalază din hematii, ficat, justifică implicarea ei în procese unde se produc cantități crescute de H_2O_2 (Jones P., 2001).

3) Glutation peroxidaza conține seleniu ca parte activă. Acumularea formei oxidate a glutatationului, format atât prin acțiunea GSH peroxidazei sau neenzimatic, pare să fie un indice al stresului oxidativ la nivel celular. GSH peroxidaza mai intervine ca reglator în biosinteza prostaglandinelor prin inhibarea lipooxygenazei. Importanța GSH peroxidazei în biosinteza prostaglandinelor este atât de mare, încât în deficit de seleniu apar leziuni ale endoteliului unor vase și tulburări ale agregării trombocitare, prin dereglarea biosintezei prostaciclinelor (Katerji M. et al. 2019).

4) Glutation S-transferaza se găsește intracelular. Catalizează conjugarea glutatationului cu diferiți compuși în condițiile poluării chimice [6]. Există o mare varietate de izoenzime ale acestui antioxidant care sunt exprimate omniprezent la oameni. Pe lângă rolul lor catalitic în conjugarea GSH la o varietate de componente dăunătoare, un număr de izoenzimele reduc hidroperoxidii și detoxifică produșii finali rezultați din peroxidarea lipidelor.

ANTIOXIDANȚII NEENZIMATICI:

Spre deosebire de sistemele antioxidante enzimatic, care sunt limitate la cele patru enzime, antioxidanții neenzimatici cuprind o grupă foarte mare de substanțe a căror listă este în continuă creștere.

1) Glutationul redus (L-alfa-glutamyl-Lcisteinil-glicocol) (GSH) este principalul antioxidant neenzimatic intracelular. Este un transportor al grupărilor -SH libere. Atât neenzimatic, cât și acționând drept coenzimă a GSH peroxidazei sau transferazei, GSH este implicat în neutralizarea unor substanțe nocive endogene sau din mediu, a RLO generați de intoxicațiile acute și cronice și în reacții cu compuși organici și radicali liberi (Katerji M. et al. 2019).

R. 2.5.3 Utilizarea de assay-uri specifice pentru cuantificarea stresului oxidativ în vederea elaborării unor strategii antimicrobiene

2) Vitamina E (α -tocoferol) este admisă ca cel mai important antioxidant liposolubil, al cărui rol de bază este păstrarea integrității membranelor. Vitamina E reprezintă o țintă pentru RL și este un eficient inhibitor al evoluției lanțului oxidativ (Lee GY, Han S., 2018). S-a demonstrat că vitamina E se regenerează continuu, iar acest fapt mărește eficiența ei în stări patologice în care are loc o liză celulară (Yang CS. Et. al., 2020).

3) Acidul ascorbic. Discuțiile asupra utilității terapeutice ale vitaminei C au un ecou mare și în opinia publică. Principalele implicații ale vitaminei C sunt: rolul antiinfecțios care se bazează pe efectele modulatorie ale acidului ascorbic în imunitatea celulară, rolul detoxifiant se bazează pe accelerarea metabolizării substanțelor xenobiotice, rolul antioxidant este cel mai controversat deoarece o serie de lucrări menționează vitamina C printre captatorii de RL, iar alte lucrări aduc argumente în favoarea rolului pro-oxidant, mai ales în experimentele în vitro (El Halabi et. al., 2018).

4) Seleniul acționează nu numai prin GSH peroxidază, dar și independent sau în asociație cu vitamina (Sies H, Jones DP., 2020).

5) Beta-carotenii și vitamina A, deși au efecte puternic antioxidante, sunt cunoscute mai ales printre compușii anticancerigeni. Numeroase lucrări au demonstrat caracterul lor antioxidant, blocant al propagării peroxidării și scavenger al oxigenului singlet (Katerji M. et. al. 2019).

2. Speciile reactive ale oxigenului la bacterii

Stresul oxidativ din celulele microbiene împărtășește multe asemănări cu alte tipuri de celule, dar are caracteristicile sale specifice care pot diferi în celulele procariote și eucariote (Sigler K. Et. al., 1999). O serie de studii având ca scop elucidarea mecanismului prin care bacteriile reacționează la atacul SRO, au utilizat modele bacteriene (*Escherichia Coli* și *Pseudomonas aeruginosa*), reușind astfel să caracterizeze răspunsurile adaptative ale acestora, rezultând trei concluzii (Kim S. et. al., 2019; Dahl JU. Et. al., 2015):

- În primul rând, fiecare specie de SRO își declanșează propriul tip de răspuns
- În al doilea rând, răspunsul SRO este sub un control reglator în ceea ce privește inducerea proteine și enzime cu rol în apărarea antioxidantă
- În al treilea rând, mecanismele de răspuns sunt relativ conservate în majoritatea speciilor bacteriene.

Prin urmare, se pare că rezultatele obținute prin utilizarea modelelor de *Escherichia Coli* și *Pseudomonas aeruginosa* se pot extrapola pentru a imagina răspunsurile bacteriene generale la SRO. Ambele specii bacteriene se pare că reacționează în același mod: realizează apărarea antioxidantă acționând la toate nivelurile posibile (Kim S. et. al., 2019).

- bacteriile încearcă permanent prevenirea atacurilor SRO,
- odată declanșată ofensiva SRO se încearcă interceptarea și blocarea radicalilor,
- dacă au fost produse pagube, se trece la reparație.

Astfel, celulele bacteriene își pregătesc potențiala apărare menținând un nivel bazal de enzime capabile să elimine SRO precum O_2^- și H_2O_2 , păstrându-și astfel concentrațiile în limite de siguranță.

R. 2.5.3 Utilizarea de assay-uri specifice pentru cuantificarea stresului oxidativ în vederea elaborării unor strategii antimicrobiene

Apărarea împotriva SRO este realizată și de enzime antioxidante, metale, scavenger-ii radicalilor, proteine de protecție și enzime reparatoare (Palmer LD, Skaar EP., 2016).

Data fiind creșterea rezistenței la antibiotice din ultimul timp, pot fi luate în considerare anumite strategii antimicrobiene bazate pe generarea de SRO. Pentru aprofundarea felului în care acest lucru ar putea fi realizat, vom face o scurtă trecere în revistă a modului în care acționează antibioticele asupra bacteriilor [23, 24]. Deocamdată nu e clar dacă e vorba de un singur mecanism sau mai multe, care odată declanșate să ducă în final la moartea bacteriei. Sigur însă, este faptul că principalele **medicamente antibacteriene vizează trei ținte la nivelul bacteriilor:**

- Peretele celular bacterian
Penicilina de exemplu, favorizează transpeptidarea adică inhibarea formării de legături încrucișate de tip peptidoglican în peretele celular bacterian. Rezultatul este un perete celular foarte fragil care se dezintegrează, ucigând bacteria.
- Sinteza bacteriană a proteinelor
Antibioticele pot inhiba sinteza anumitor proteine. Tetraciclina, de exemplu, poate traversa membrana peretelui bacterian și se acumulează în concentrații mari în citoplasmă acasteia. Apoi se fixează pe subunitatea ribozomală 30S și blochează ARN-ul și în felul acesta oprește alungirea lanțului proteic (Marrakchi M. et. al., 2014; Kohanski MA et. al., 2010).
- Replicarea și repararea ADN-ului bacterian
Topologia cromozomială bacteriană este menținută prin activitatea a trei enzime: topoizomeraza I, topoizomeraza IV și ADN girazei (topoizomeraza II). Acțiunea acestor enzime este dezorganizată de chinolona sintetică, un antibiotic care vizează complexe ADN-topoizomerază. Prin această acțiune, se ajunge la inhibarea completă a diviziunii celulare, cu efect bacteriostatic și în final la moartea bacteriei (Kohanski MA et. al., 2010).

Într-un studiu realizat de Kohanski și colaboratorii în anul 2007 s-a arătat că trei dintre clasele principale de medicamente bactericide, utilizează un mecanism comun de inactivare prin care stimulează producerea de doze letale de radicali hidroxil prin reacția Fenton (Kohanski MA et. al., 2007). Stresul oxidativ declanșat contribuie la moartea celulară mediată de antibiotice. Tot în cadrul acestui studiu s-a demonstrat faptul că stresul oxidativ este implicat în dobândirea rezistenței la antibiotice a bacteriilor patogene prin alterarea mecanismelor de apărare antioxidantă a celulelor. În concluzie, stresul oxidativ poate fi considerat ca un posibil mecanism prin care se exercită efectele antibioticelor și pe de altă parte, ca factor implicat în dezvoltarea rezistenței bacteriilor la antibiotice (Imlay JA, 2013).

Mecanisme de protecție a bacteriilor împotriva stresului oxidativ

Bacteriile trăiesc într-o lume toxică în care concurenții lor excretă peroxid de hidrogen sau compuși redox care generează superoxid. Pentru a face față atacului SRO, bacteriile și-au dezvoltat o serie de strategii de apărare. Modelul de studiu cel mai frecvent utilizat este cu E. Coli iar enzimele implicate sunt: SOD în studiul degradării anionului superoxid, peroxidazele și catalazele pentru degradarea apei oxigenate. Mutantele cărora le lipsesc aceste enzime suferă alterări și ale enzimelor care au ca și cofactor fierul (catalaze, peroxidaze și ribonucleotid-reductaze).

R. 2.5.3 Utilizarea de assay-uri specifice pentru cuantificarea stresului oxidativ în vederea elaborării unor strategii antimicrobiene

De asemenea, în urma reacției dintre fierul bivalent intracelular și apa oxigenată, rezultă radicali hidroxil, care vor reacționa, la rândul lor, cu toate biomoleculele. La nivelul ADN-ului, acești radicali produc leziuni care sunt incompatibile cu activitatea ADN-polimerazei și cu replicarea, iar dacă leziunile sunt majore, finalul îl reprezintă moartea celulară.

Rezultatele studiului publicat de Imlay JA în 2015 sugerează faptul că bacteriile se protejează prin activarea așa numitor reguloni controlați de o serie de factori de transcripție (Imlay JA, 2015). Un obiectiv cheie al activității actuale este identificarea circumstanțelor naturale în care regulonii sunt activați. Aceștia percep peroxidul atunci când oxidează porțiuni cheie de tiolat sau de fier, ei induc apoi formarea unor seturi de proteine care vor declanșa apărarea unor enzimele vulnerabile.

La unele bacterii non-enterice, o parte din factorii de transcripție controlează sinteza și exportul compușilor din ciclul redox, în timp ce la bacteriile enterice apără celula împotriva aceluiași agenți. În plus, unele bacterii pot induce enzime care apără celula împotriva superoxidului pe care îl produc acești compuși. Rezultatele studiilor asupra bacteriilor non-enterice sunt promițătoare și par să ofere în viitor o oarecare claritate privind felul în care microbii se protejează în fața atacului SRO.

3. Cuantificarea stresului oxidativ în sistemele procariote (bacterii)

Dezvoltarea metodelor capabile să coreleze stresul oxidativ cu răspunsul bacterian ar putea contribui la obținerea unei perspective asupra dezvoltării de noi strategii antibacteriene. Din păcate, tendința SRO de a dobândi electroni îi face să fie foarte reactivi, cu o durată scurtă de viață și prin urmare, foarte greu de detectat. Totuși există o serie de metode utile în acest sens.

1. Metode bazate pe chemiluminescență

Mai multe studii au folosit chemiluminescența pentru a testa prezența SRO în bacterii.

Principiul metodei constă în legarea colorantului / complexului enzimatic (luminofori) la specia reactivă de oxigen (SRO) vizată și emiterea de lumină, a cărei intensitate este direct proporțională cu SRO. Măsurarea se face cu luminometre, iar valorile se exprimă în unități relative de lumină (URL) (Yamazaki T. Et. al., 2011) sau prin citometrie în flux (Yeom J. et. al., 2010).

Albesa și colaboratorii au folosit chemiluminescența pentru a evalua implicarea stresului oxidativ, în special rolul superoxidului în acțiunea antibioticelor împotriva diferitelor bacterii, inclusiv *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* și *Enterococcus faecalis* (Albesa I. et. al., 2004). Folosind chemiluminescența, acest grup de cercetători a găsit că diverse antibiotice pot crește eliberarea superoxidului în diferite tulpini, dar numai acele tulpini sensibile la antibiotice prezintă răspuns la stres oxidativ.

R. 2.5.3 Utilizarea de assay-uri specifice pentru cuantificarea stresului oxidativ in vederea elaborarii unor strategii antimicrobiene

Alte studii au demonstrat rolul radicalilor hidroxil ($\text{OH}\bullet$) ca un factor esențial al răspunsului la stres oxidativ. Un studiu realizat de Kohanski și colaboratorii a urmărit *E. Coli* tratat cu norfloxacină, ampicilină și kanamicină și *Staphylococcus aureus* tratat cu norfloxacină și cloramfenicol și a demonstrat eliberarea de radicali hidroxil prin reacția Fenton (Kohanski MA et. al., 2007).

Pentru a evalua formarea radicalilor hidroxil s-a utilizat un colorant specific - hidroxifenil fluoresceina (HPF). Rezultate similare au fost observate și în cazul *E. coli* tratată cu norfloxacină după adăugare de HPF. Un grup de cercetători coordonați de Yeom J au demonstrat în anul 2010 că antibioticele ar putea accelera moartea celulelor prin promovare a reacției Fenton care duce la un răspuns oxidativ la stres în cazul bacteriei *Pseudomonas aeruginosa* tratată cu ampicilină (Yeom J. et. al., 2010). Rezultatele studiului demonstrează faptul că acțiunea antibiotică este afectată de modularea reducerii nivelurilor de nicotinamidă-adenină dinucleotidă (NADH) și chelarea fierului. Pe lângă măsurători directe sau indirecte ale SRO, implicarea SRO în moartea celulelor și rezistența la antibiotice poate fi, de asemenea, evaluată prin utilizarea de scavengerilor SRO.

2. Metode care utilizează citometria în flux

Acest tip de metodă este relativ nou în a cuantificarea stresului oxidativ la bacteriile supuse tratamentului cu antibiotice. În anul 2018 un grup de cercetători de la Universitatea din Geneva conduși de Daniel Manoil și-au propus să evalueze stresul oxidativ la bacterii cu ajutorul flow citometriei (Manoil D. Et. al., 2018). Aceștia au utilizat kitul DeepRO CellROX® care combină un fluorofor sensibil la SRO (CellROX® Deep Red) și un colorant pentru aprecierea viabilității celulare (SYTOX® Blue) pentru a permite detectarea celulelor neoxidate, oxidate și deteriorate. Bacteriile *Enterococcus faecalis* și *Fusobacterium nucleatum* au fost luate în studiu și au fost supuse stresului oxidativ. O concentrație optimă de CellROX® a fost determinată pe *Enterococcus faecalis* și *Fusobacterium nucleatum* expuse la stres oxidativ (H_2O_2).

Bacteriile au fost expuse la diferite concentrații de H_2O_2 și etichetate cu CellROX® pentru a verifica dacă fluorescența a crescut împreună cu stresul oxidativ. De asemenea, bacteriile expuse la H_2O_2 au fost dublu colorate cu CellROX® și SYTOX® Blue și analizate prin citometrie în flux. Ambele tulpini au fost marcate cu CellROX® Deep Red.

Fluorescența bacteriilor etichetate cu CellROX® Deep Red a crescut în mod corespunzător odată cu stresul oxidativ aplicat. Analiza de citometrie de flux a probelor dublu colorate a arătat subpopulații de bacterii cu semnal CellROX® crescut atunci când este stresat și o absorbție mai mare a SYTOX® Blue sub stres oxidativ mai mare. Rezultatele acestui studiu indică faptul că CellROX® Deep Red poate fi aplicat pentru a măsura stresul oxidativ la *E. faecalis* și *F. Nucleatum* iar combinația dintre CellROX® și SYTOX® Blue a permis discriminarea bacteriilor neoxidate, oxidate și deteriorate.

3. Metode bazate pe utilizarea captatorilor de radicali liberi / antioxidanți

Principiul acestei metodei se bazează pe adăugarea de antioxidanți (tiouree; 2,2-bipiridil; glutation; acid ascorbic), în culturile bacteriene expuse la antibiotice ce determină stres oxidativ care protejează celulele de efectele nocive ale SRO și astfel, crește rata de supraviețuire a bacteriilor. Goswami și colaboratorii au investigat implicarea SRO la acțiunea Ciprofloxacinei asupra *Escherichia coli* (Goswami M. et. al., 2006).

Ciprofloxacina este un membru important și frecvent utilizat al fluorochinolonei. Mecanismul ei de acțiune se bazează pe inhibirea activităților ADN topoizomerazei II și ADN topoizomerazei IV, ducând în cele din urmă la moartea celulelor bacteriene. În plus, a fost demonstrată o creștere a SRO în celulele bacteriene ca răspuns la acțiunea ciprofloxacinei. Acești cercetători au investigat rolul SRO în acțiunea antibacteriană a ciprofloxacinei prin studierea efectelor diferiților compuși antioxidanți asupra susceptibilității *Escherichia coli* la ciprofloxacina.

Dintre antioxidanții verificați, glutationul și acidul ascorbic au asigurat o protecție substanțială împotriva ciprofloxacinei. Implicarea anionului superoxid (O_2^-) și peroxid de hidrogen (H_2O_2) în acțiunea antibacteriană a ciprofloxacinei a fost analizată folosind superoxid dismutază, catalază și alchil hidroperoxid reductaza. Rezultatele acestui studiu sugerează că O_2^- și H_2O_2 pot fi implicați în acțiunea antibacteriană a ciprofloxacinei, că speciile SRO pot avea un rol similar în acțiunea antibacteriană a tuturor acestor fluorochinolone și că protecția mediată de glutation nu este o fenomen general ci specific fluorochinolonei.

4. Metode bazate pe utilizarea tulpinilor mutante

Investigarea proceselor legate de stresul oxidativ și a rolului SRO în bacteriile expuse la antibiotice oferă informații valoroase cu privire la mecanismul morții celulare mediată de antibiotice bactericide și implicarea SRO în acest proces. O altă strategie de evaluare a eliberării SRO în bacteriile tratate cu antibiotice este utilizarea de tulpini mutante care au un mecanism de apărare antioxidant modificat. Sistemul defensiv antioxidant al bacteriilor cuprinde enzime antioxidante specifice, inclusiv superoxid dismutază (SOD), catalază și peroxidază. Prin manipularea tulpinilor de *E. coli*, poate fi generată o tulpina knockout pentru a crea o stare de dezechilibru artificial care permite studiul selectiv al mecanismelor oxidante / antioxidante.

Principiul metodei de determinare se bazează pe:

1. utilizarea tulpinilor sensibile la antibioticul de testat, în comparație cu cele rezistente sau a tulpinilor „knockout” (bacterii cărora, prin manipulare genetică, le-au fost inactivate genele specifice implicate în apărarea împotriva stresului oxidativ, în special, cele răspunzătoare de SOD, catalază și peroxidază)
2. evidențierea anumitor gene care sunt exprimate ca răspuns la stresul oxidativ

5. Investigațiile proteomice

Se bazează pe utilizarea următoarelor metode:

- Spectrometrie de masă – ESI (ionizare în electrospray) și MALDI (ionizarea prin desorbția laser asistată de o matrice solidă) – identificarea proteinelor/izoformelor afectate de stresul oxidativ și gruparea lor după funcția pe care o îndeplinesc.
- Electroforeza în gel - identificarea proteinelor/izoformelor afectate de stresul oxidativ, pe baza greutății moleculare.
- PCR – identificarea și ulterior, expresia secvențelor de ADN responsabile de apariția SO.

Un studiu publicat de Huang CH și colaboratorii în anul 2011, având ca scop analiza proteomică a proteinelor up-reglate ale bacteriei *Helicobacter pylori* supusă stresului oxidativ a dus la rezultate foarte interesante (Huang CH, Chiou SH, 2011).

Se știe că dezvoltarea cancerului gastric este asociată cu inflamația cronică apărută ca o consecință a infecției cu *Helicobacter pylori*. În astfel de inflamații, stresul oxidativ indus de speciile reactive de oxigen *in vivo* poate exercita efecte bidirecționale, atât asupra gazdelor, cât și asupra *Helicobacter pylori*. În acest studiu, stresul oxidativ indus de SRO a fost mimat în cocultură a celulelor epiteliale gastrice cu *Helicobacter pylori* tratate cu apă oxigenată (H_2O_2).

Pentru a investiga efectul H_2O_2 asupra proteomului *Helicobacter pylori*, a fost efectuată electroforeză bidimensională pe gel de poliacrilamidă, urmată de cromatografie lichidă cu spectrometrie de masă și analiza bioinformatică a bazei de date. S-a constatat prezența unor proteine supraexprimate: proteina A asociată cu citotoxina (CagA), citotoxină vacuolantă (VacA), proteina de aderență (AlpA), două enzime antioxidante - alchilhidroperoxid reductază (AhpC) și catalază (KatA), plus o serin protează (HtrA), aconitat hidratază și fumarat reductază. De asemenea, s-a observat up-regularea unor factori de virulență și proteine antioxidante în mai multe tulpini de *Helicobacter pylori* izolate de la pacienți. Mai mult, s-a constatat că a scăzut rata infecției cu *Helicobacter pylori* și proliferarea a crescut după expunerea la H_2O_2 .

De asemenea, s-a observat că celulele epiteliale gastrice pot fi protejate de deteriorarea oxidativă de H_2O_2 în prezența *Helicobacter pylori*. În concluzie, acest studiu susține presupunerea că speciile reactive ale oxigenului conținând H_2O_2 pot induce up-regularea factorilor de virulență și a enzimelor antioxidante ale *Helicobacter pylori* și care pot explica inflamația ce contribuie la dezvoltarea cancerului gastric din infecția cu *Helicobacter pylori*.

6. Senzorii electrochimici

Permit cuantificarea în timp real a stresului oxidativ în sisteme biologice complexe.

Dezavantaje: dificultăți de calibrare și uneori, de operare, în sisteme biologice complexe, din cauza interferării dintre radicalii liberi formați și a instabilității acestora.

R. 2.5.3 Utilizarea de assay-uri specifice pentru cuantificarea stresului oxidativ in vederea elaborarii unor strategii antimicrobiene

Bibliografie

1. Albesa I et al, Oxidative stress involved in the antibacterial action of different antibiotics, *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 317(2):605–609
2. Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O, Oxidative Stress and Antioxidant Defense, *World Allergy Organ J*. 2012 Jan; 5(1): 9–19.
3. Cuzzocrea S, Riley DP, Caputi AP, Salvemini D, Antioxidant therapy: A new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury, *Pharmacol Rev* 2001;53: 135-159.
4. Dahl JU, Gray MJ, Jakob U, Protein quality control under oxidative stress conditions. *J. Mol. Biol.* 2015, 427, 1549–1563
5. El Halabi I, Bejjany R, Nasr R, Mukherji D, Temraz S, Nassar FJ, El Darsa H, Shamseddine A, Ascorbic Acid in Colon Cancer: From the Basic to the Clinical Applications, *Int J Mol Sci.* 2018 Sep 13;19(9):2752-2761
6. Ezraty B, Gennaris A, Barras F, Collet J-F, Oxidative stress, protein damage and repair in bacteria, *Nature Reviews Microbiology*, 15, 385–396 (2017)
7. Goswami M, Mangoli SH, Jawali N. Involvement of reactive oxygen species in the action of ciprofloxacin against *Escherichia coli*, *Antimicrob Agents Chemother*, 2006.;50(3):949–954
8. Huang C-H, Chiou S-H, Proteomic analysis of upregulated proteins in *Helicobacter pylori* under oxidative stress induced by hydrogen peroxide, *Kaohsiung J Med Sci*, 2011; 27(12):544–553
9. Imlay JA, Chin SM, Linn S. Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction in vivo and in vitro. *Science*. 1988; 240:640–2.
10. Imlay JA, The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: lessons from a model bacterium, *Nat Rev Microbiol*, 2013, 11(7):443–454
11. Imlay JA, Transcription factors that defend bacteria against reactive oxygen species, *Annu Rev Microbiol*. 2015 October 15; 69: 93–108.
12. Jones P, Roles of water in heme peroxidase and catalase mechanisms, *J Biol Chem* 2001; 276(17): 13791-13796
13. Katerji M, M Filippova, P Duerksen-Hughes, Approaches and Methods to Measure Oxidative Stress in Clinical Samples: Research Applications in the Cancer Field, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019
14. Kim S, Park C, Jang H, B Kim, H Bae, I Chung, E Kim, Y Cho, Antibacterial strategies inspired by the oxidative stress and response networks, *Journal of Microbiology* (2019) Vol. 57, No. 3, pp. 203–212.
15. Kohanski MA et al, A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics, *Cell*, 2007, 130(5):797–810
16. Kohanski MA, Dwyer DJ, Collins JJ, How antibiotics kill bacteria: from targets to networks, *Nat Rev Microbiol*, 2010, 8(6):423–435
17. Lee GY, Han S, The Role of Vitamin E in Immunity, *Nutrients*. 2018 Nov 1;10(11):1614-1628
18. Manoil D, Bouillaguet S, Oxidative Stress in Bacteria Measured by Flow Cytometry. *Adv Biotech & Micro*, 2018;8(1):555726
19. Marrakchi M, Liu X, Andreescu S. Oxidative stress and antibiotic resistance in bacterial pathogens: state of the art, methodologies, and future trends. *Adv Exp Med Biol*. 2014; 806:483-98.
20. Olanow CW, A radical hypothesis for neurodegeneration, *TINS* 1993; 16(11): 439-444.
21. Olinescu R, Radicalii liberi în fiziopatologia umană, Ed. Tehnică, București, 1994.
22. Palmer LD, Skaar EP, Transition metals and virulence in bacteria, *Annu. Rev. Genet.*, 2016, 50, 67–91
23. Rai P, Cole TD, Wemmer DE, Linn S. Localization of Fe(2+) at an RTGR sequence within a DNA duplex explains preferential cleavage by Fe(2+) and H2O2. *J Mol Biol*. 2001; 312:1089–101.
24. Seki M, Iida K, Saito M, Nakayama H, Yoshida S. Hydrogen peroxide production in *Streptococcus pyogenes*: involvement of lactase oxidase and coupling with aerobic utilization of lactate. *J. Bacteriol*. 2004; 186:2046–51.
25. Sies H, Jones DP, Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents, *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2020 Jul;21(7):363-383

R. 2.5.3 Utilizarea de assay-uri specifice pentru cuantificarea stresului oxidativ in vederea elaborarii unor strategii antimicrobiene

26. Sigler K, Stadler N, Brozmanova J, Oxidative stress in microorganisms, *Folia Microbiologica*, 1999, 44(6), 587-624
27. Wei JP, Srinivasan C, Han H, Valentine JS, Gralla EB, Evidence for a novel role of copper-zinc superoxide dismutase in zinc metabolism, *J Biol Chem* 2001
28. Winterbourn CC, Hampton MB, Livesey JH, Kettle AJ. Modeling the reactions of superoxide and myeloperoxidase in the neutrophil phagosome. Implications for microbial killing. *J. Biol. Chem.* 2006; 281:39860-9.
29. Wright GD, On the road to bacterial cell death. *Cell*, 2007, 130(5):781-783
30. Yamazaki T, Kawai C, Yamauchi A, Kuribayashi F. A highly sensitive chemiluminescence assay for superoxide detection and chronic granulomatous disease diagnosis. *Trop Med Health*, 2011, 39(2):41-45
31. Yang CS, Luo P, Zeng Z, Wang H, Malafa M, Suh N, Vitamin E and cancer prevention: Studies with different forms of tocopherols and tocotrienols, *Mol Carcinog.* 2020 Apr;59(4):365-389
32. Yeom J, Imlay JA, Park W. Iron homeostasis affects antibiotic-mediated cell death in pseudomonas species. *J Biol Chem*, 2010; 285(29):22689-22695
33. <https://ro.dralexjimenez.com/El-paso-tx-stres-oxidativ-antioxidant-ap%C4%83rare/>