

## СЕРОВОДОРОД ВЫСТУПАЕТ МЕДИАТОРОМ NO-СИГНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ, ТЕМ САМЫМ СТИМУЛИРУЯ ДИСПЕРСИЮ БИОПЛЕНОК

Телегина Д.И.<sup>1,2</sup>, Васильева С.В.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева  
Миусская площадь, 9, г. Москва, 125047, РФ; e-mail: daryakinder62@gmail.com

<sup>2</sup> Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова  
Трубецкая ул., 8, стр. 2, г. Москва, 119991, РФ

<sup>3</sup> ФГБУН Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН  
ул. Косыгина, 4, г. Москва, 117977, РФ

Поступила в редакцию: 15.07.2021

**Аннотация.** Впервые был применен комплексный подход к изучению взаимодействия монооксида азота и сероводорода-газотрансмиттеров, которые продуцируются бактериальными клетками в качестве сигнальных молекул. При исследовании кристаллических нитрозильных комплексов железа было установлено, что комбинированная обработка NO-донором и сероводородом, при условии 2.5-кратного избытка H<sub>2</sub>S на каждую NO-группу донора, стимулирует увеличение NO-сигнальной активности за счет образования более активных ДНКЖ с персульфидными лигандами в клетке, которые, в отличие от ДНКЖ с тиоловыми лигандами, дают характерный «узкий» ЭПР сигнал с  $g_{\text{aver}} = 2,03$  ( $g_{\perp} = 2,032$ ,  $g_{\parallel} = 2,02$ ). Таким образом, H<sub>2</sub>S выступает медиатором NO-сигнальной активности, тем самым стимулируя значительное увеличение уровня экспрессии гена soxS. Влияние комбинированной обработки на уровень экспрессии гена sfiA обнаружено не было. Данное явление обуславливает снижение уровня окислительного стресса при совместной обработке NO-донором и H<sub>2</sub>S, что оказывает значительное влияние на снижение продуктивности формирования биопленок (в среднем на 30% относительно монообработки) и увеличение показателей дисперсии зрелых биопленок (в среднем на 25% относительно монообработки). Мы предполагаем, что применение комплексной обработки кристаллическими нитрозильными комплексами железа с сероводородом может быть востребовано для решения проблем борьбы с инфекциями, вызываемыми бактериальными биопленками.

**Ключевые слова:** монооксид азота, сероводород, биопленки, сигнальная активность.

В настоящее время одной из острых проблем современной медицины является способность бактерий к пленкообразованию. Так, бактерии, заключенные в биопленки, менее восприимчивы к широкому спектру противомикробных препаратов и иммунной защите хозяина [1]. Биопленки вовлечены в патогенез многочисленных хронических заболеваний, они составляют 65–80% от всех бактериальных инфекций по распространению, что только подчеркивает необходимость разработки новых стратегий лечения [2]. Потенциально перспективным способом борьбы выступает инициирование скоординированного рассеивания под действием адаптивного ответа на различные специфические сигналы, такие как уровень доступности питательных веществ, особенно железа, окислительного стресса, а также воздействием важной сигнальной молекулы монооксида азота (NO)[3]. На данный момент существует множество работ, посвященных донорам NO, в качестве перспективных регуляторов биопленок. Большинство известных NO доноров обладают рядом недостатков, например, образование токсичных продуктов в результате их разложения, из-за чего их клиническое применение ограничено. Следовательно, крайне востребованными выступают работы по разработке и дальнейшим исследованиям эндогенных носителей, естественных переносчиков NO, у которых бы отсутствовали данные недостатки. Одним из таких потенциально перспективных классов соединений, обуславливающих ослабленное токсическое действие, являются нитрозильные комплексы железа с различными лигандами, которые представляют собой биомиметики активных железо-серных кластеров [Fe-S] белков.

У ряда патогенных бактерий, в том числе *P. aeruginosa* и *E.coli*, способность к рассеиванию недавно была связана с уровнем нитрозативного стресса, который является результатом эндогенного и экзогенного воздействия активных форм азота. Так как помимо своих повреждающих свойств NO модулирует глобальные регуляторные сети путем взаимодействия с бактериальными регуляторами транскрипции SoxR[4], OxyR [5], и участвует в формировании SOS-ответа[6]. Так, SoxR, содержащий кластер [2Fe – 2S], активируется под действием NO в результате трансформирования SoxR в динитрозильный комплекс железа. Активированный SoxR, в свою очередь, стимулирует транскрипцию soxS гена, кодирующего регулятор SoxS, ответственного за активацию экспрессии SoxRS регулона, в состав которого входят 15 генов, в том числе и ген супероксиддисмутазы *sodA*[7].

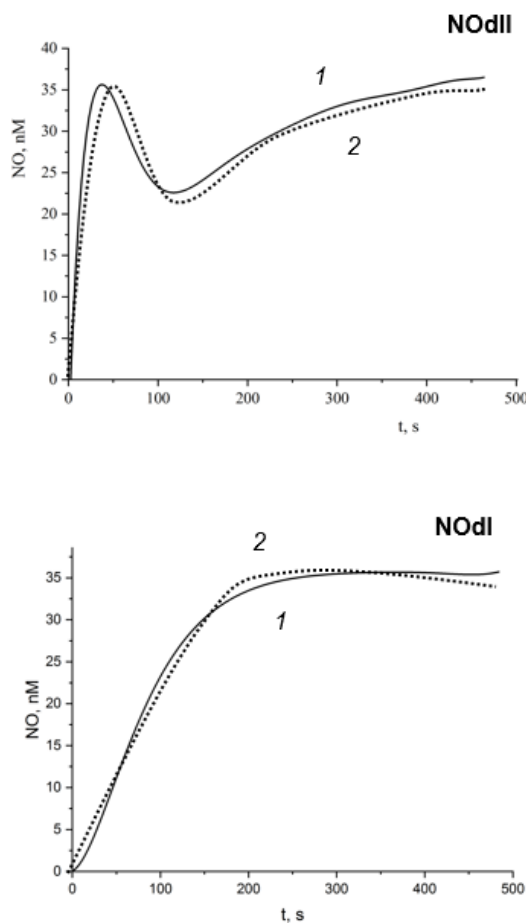
В данной работе, в результате обобщения текущих знаний о молекулярных механизмах регуляции жизненного цикла пленкообразующих бактерий, которые подробно описаны в данном обзоре [8], исследовали тетранитрозильный биядерный комплекс железа с тиомочевинной  $\text{Fe}(\text{SC}(\text{NH}_2)_2)_2(\text{NO})_2)_2(\text{Fe}_2(\text{S}_2\text{O}_3)_2(\text{NO})_4$  (NOdII) и биядерный нитрозильный комплекс железа с тиосульфатным лигандом  $\text{Na}_2[\text{Fe}_2(\text{S}_2\text{O}_3)_2(\text{NO})_4] \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (NOdI). Подробные сведения о синтезе и свойствах данных кристаллических нитрозильных комплексов железа описаны в [9, 10].

Основываясь на том, что клетки *E. coli* с нокаутированным геном синтеза  $H_2S$  осуществляли сверхсинтез  $NO$ , было предположено, что существуют молекулярно-генетические механизмы взаимодействия данных “газотрансмиттеров”, связанные защитой с бактериальных клеток от различного рода стресса [11], поскольку  $H_2S$ , активная физиологическая форма которого не установлена, является потенциальным поглотителем пероксинитрита и других реактивных форм азота и кислорода [12].  $H_2S$ -гораздо менее известная сигнальная молекула у бактерий, чем  $NO$ . Согласно [13] в *E. coli* L-цистеин является основным источником эндогенной продукции  $H_2S$  за счет совместного действия двух ферментов, генерирующих сероводород.

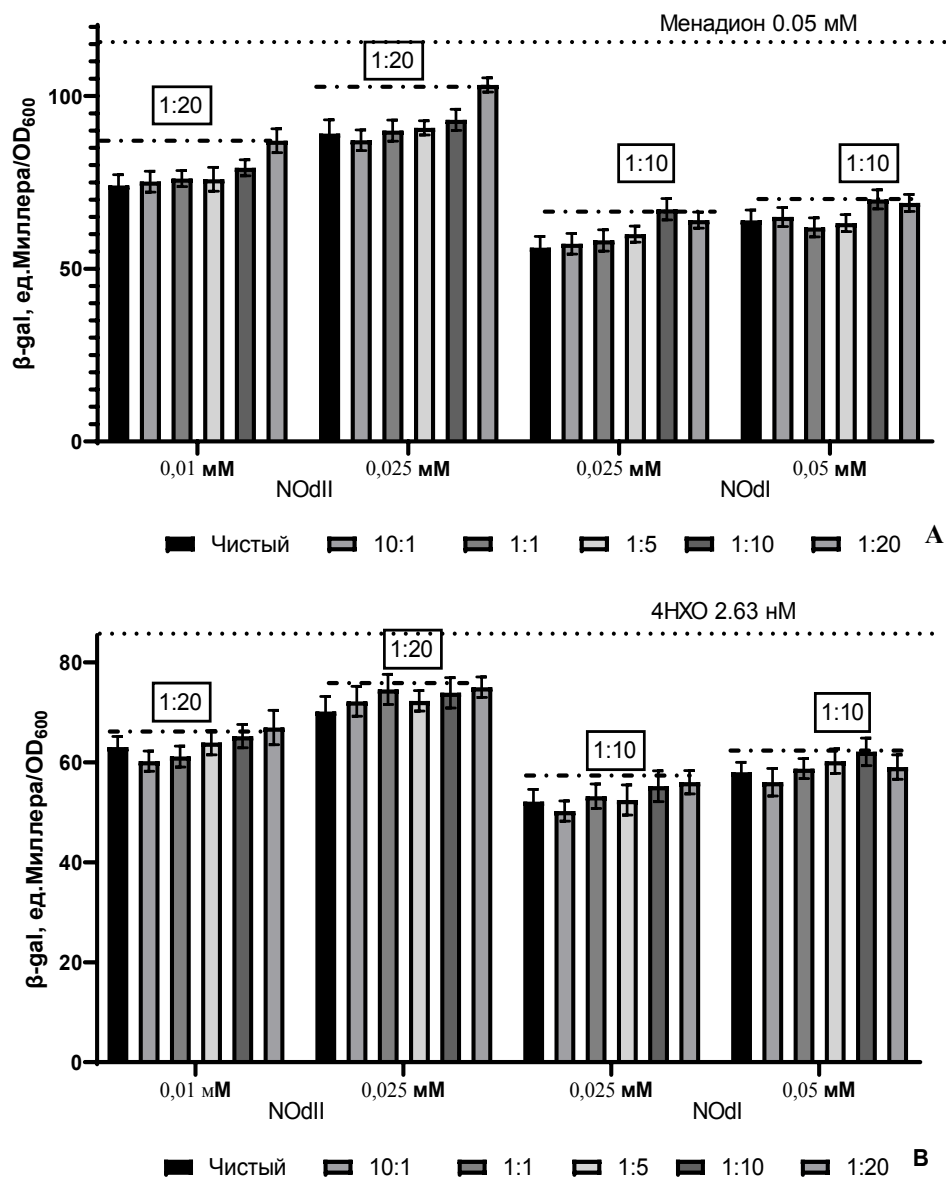
Целью данной работы было изучение сигнальных и регуляторных функций  $NO$ -доноров при взаимодействии с молекулой  $H_2S$ , оказывающих влияния на ДНК-репарационные системы и регуляцию биопленок. В качестве доноров  $H_2S$  использовали  $Na_2S$  и  $NaHS$  (Sigma, США), который в результате гидролиза дают гидросульфидный анион (при физиологическом pH является основной формой существования сероводорода). В отличие от низко реакционноспособного  $H_2S$ ,  $HS^-$  является мощным нуклеофилом, способным вступать в реакцию различными электрофилами с образованием разнообразных комплексов серы.

Амперометрическое определение  $NO$ -донорной способности катионных комплексов с помощью сенсорного электрода *amiNO-700* системы «*inNO Nitric Oxide Measuring System*» (Innovative Instruments, США) в экспериментах *in vivo* в комбинации с  $Na_2S/NaHS$  продемонстрировало, что сульфиды не изменяют количество генерируемого донорами  $NO$ , оказывая лишь небольшое влияние на начальную стадию генерации (рис.1).

Изучение влияния комбинированного действия  $NO$ -доноров с  $Na_2S/NaHS$  на активацию главных ДНК-репарационных систем *SOS* и *SoxRS* защиты клеток от стресса проводили на суспензионных культурах специально сконструированных генетически-модифицированных штаммов *E. coli PQ37* [*sfiA::lacZ*] и *E. coli TN530* [*soxS::lacZ*] соответственно. Активность  $\beta$ -галактозидазы в клетках *E. coli*, несущих слияния гена *lacZ* с промоторами исследуемых генов, определяли по методу Миллера [14]. Было установлено, что  $Na_2S/NaHS$  в концентрации 0,005 мМ-5 мМ не оказывают токсического и генотоксического действия, то есть не стимулируют увеличения экспрессии генов *sfiA* и *soxS*, на исследуемые культуры. Оптимальное соотношение  $NO:H_2S=1:2,5$ , то есть необходимо увеличение концентрации  $Na_2S/NaHS$  в 2,5 раза на каждую  $NO$ -группу  $NO$ -донора для обеспечения наибольшего увеличения уровня экспрессии генов *sfiA* и *sfiA* (рис. 2).



**Рисунок 1.** Кинетика донирования  $NO$  (нМ), генерируемого  $NO$ -донорами ( $4 \cdot 10^{-6}$  М) в водных растворах при pH 7,4 и  $T=25^\circ C$  в аэробных условиях, в чистом виде (1) или в комбинации с сероводородом[1:10](2)

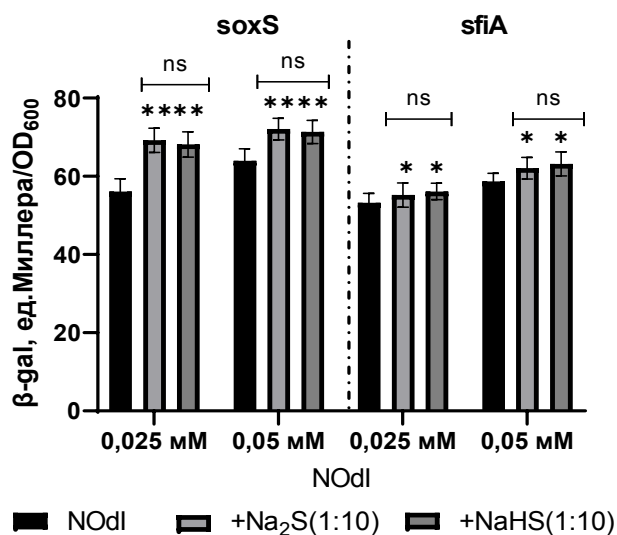


**Рисунок 2.** Уровень экспрессии гена *soxS* в *E. coli* TN530 [*soxS::lacZ*](A) и *sfiA* в *E. coli* PQ37 [*sfiA::lacZ*](B) в зависимости от соотношения NO: $\text{Na}_2\text{S}$  Данные представляют собой средние значения; полосы ошибок указывают стандартные отклонения ( $n=4$ )

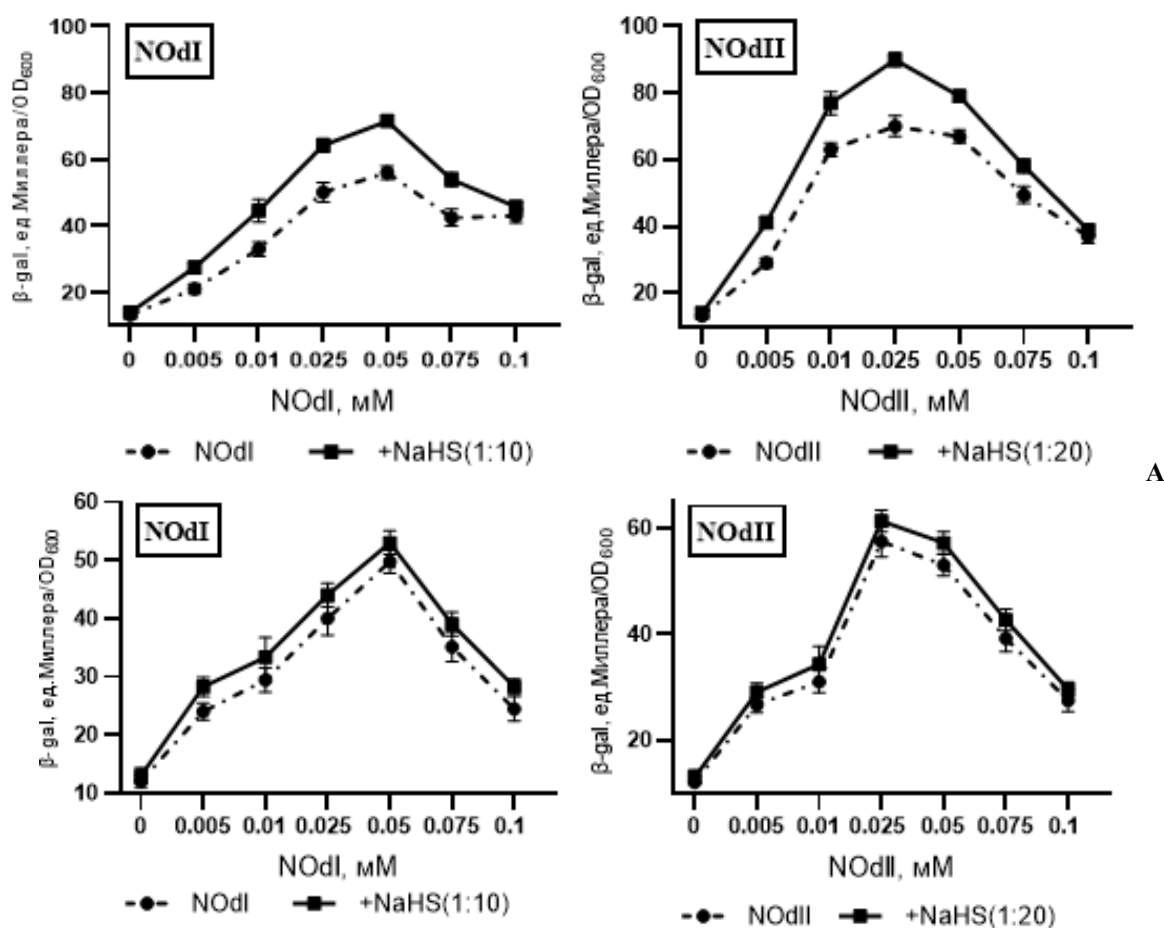
Разница между сигнальной активностью  $\text{NaHS}$  и  $\text{Na}_2\text{S}$  в комбинации с NO-донором являлась статистически незначимой (рис. 3). В дальнейшей работе в качестве донора сероводорода использовали  $\text{NaHS}$ .

Были определены дозовые зависимости экспрессии генов *soxS* и *sfiA* от концентрации NO-индукторов как в чистом виде, так и в комбинации с  $\text{NaHS}$ . Наблюдали селективное увеличение экспрессии гена *soxS* после комбинированной обработки NO-донором и  $\text{NaHS}$  (в ранее определенных оптимальных соотношениях) по сравнению с уровнем экспрессии, индуцированным только нитрозильными комплексами железа (рис. 4А). Значительных изменений в экспрессии гена *sfiA* после комбинированной обработки по сравнению с обработкой только NOd не наблюдали (рис. 4Б).

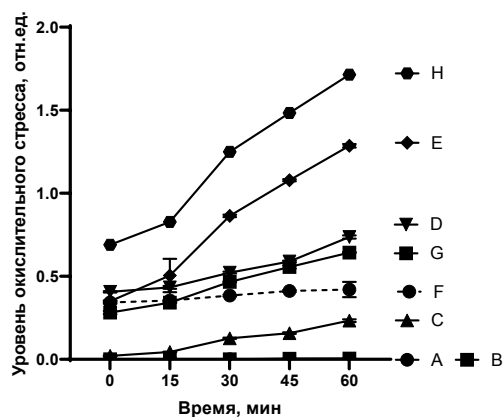
Данные показатели коррелирует с результатами, которые были получены при анализе уровня окислительного стресса с использованием Флуорометра Qubit 3 (Invitrogen, Turner BioSystems, США) и 4',6-диамидино-2-фенилиндол (DAPI)—для флуоресцентного окрашивания ДНК. Было установлено, что при обработке клеток *E. coli*  $\text{NaHS}$  в комбинации с NOdII наблюдается снижение уровня окислительного стресса относительно индивидуальной обработки клеток данными реагентами (рис. 5), что также свидетельствует о синергетическом действии  $\text{NaHS}$  при совместном использовании с донорами NO. Снижение уровня окислительного стресса было 2-кратным относительно использования чистых доноров оксида азота (продемонстрированы результаты для NOdII, для NOdI зависимости аналогичны).



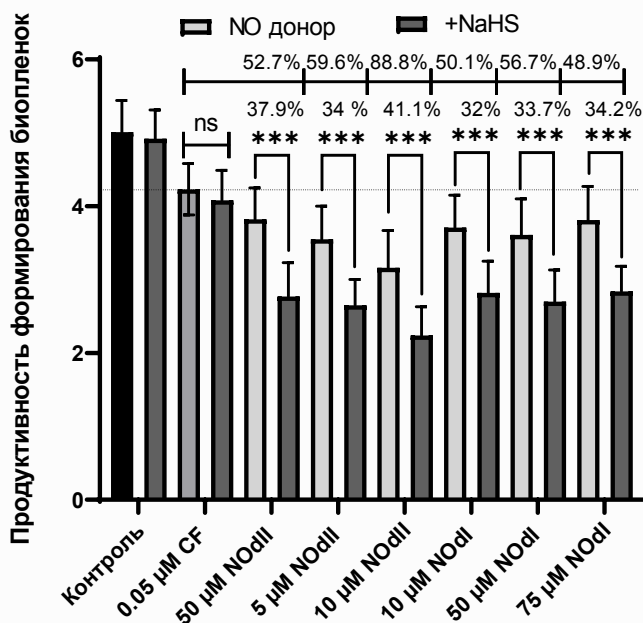
**Рисунок 3.** Зависимость уровня экспрессии гена *soxS* в *E. coli* TN530 [*soxS*::*lacZ*] и *sfiA* в *E. coli* PQ37 [*sfiA*::*lacZ*] от вида сульфида используемого в комбинации Nod:H<sub>2</sub>S. Данные представляют собой средние значения; полосы ошибок указывают стандартные отклонения (n=4); \*-P ≤ 0,1; \*\*-P ≤ 0,01; ns-статистически незначимые различия по сравнению с необработанными контрольными образцами или между различными образцами



**Рисунок 4.** Дозовая зависимость экспрессии гена *soxS* в *E. coli* TN530 [*soxS*::*lacZ*] (А) и *E. coli* PQ37 [*sfiA*::*lacZ*] (Б), обработанной NO-индуктором и комбинацией Nod+NaHS. Данные представляют собой средние значения; полосы ошибок указывают стандартные отклонения (n=4)



**Рисунок 5.** Уровень окислительного стресса (отн.ед.) в *E. coli* TN530 при pH = 7,4, обработанной NOd (индивидуально или в комбинации с H<sub>2</sub>S): А – интактный контроль(PBS), В – NaHS 0,5 мМ, С – NOdII 0,5 мМ, D – Менадион 0,5 мМ, E – NOdII 0,5 мМ, F – NaHS 0,5 мМ, G – комбинация NOdII 0,5 мМ+ NaHS 0,5 мМ, H – сумма эффектов NOdII 0,5 мМ+ NaHS 0,5 мМ

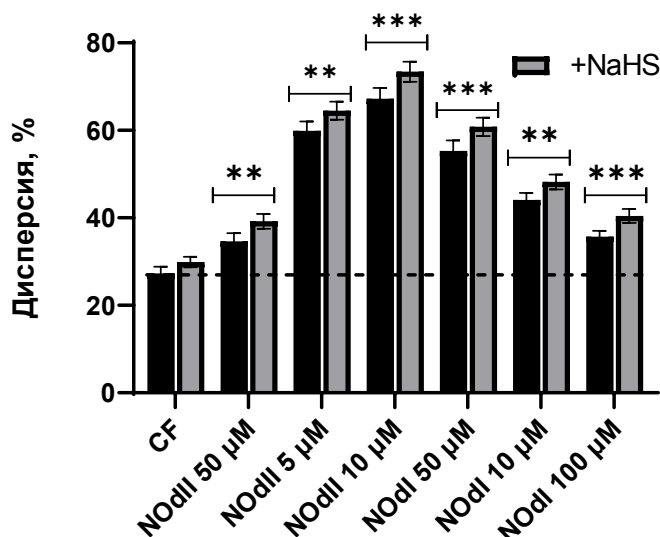


**Рисунок 6.** Снижение продуктивность формирования биопленок *P. aeruginosa* после инкубации клеток с NO-донором и комбинации NOd+NaHS/Na<sub>2</sub>S в ранее установленных оптимальных соотношениях. Данные представляют собой средние значения; полосы ошибок указывают стандартные отклонения (n=4); \*\*\*-P ≤ 0,001; ns-статистически незначимые различия по сравнению с необработанными контрольными образцами или между различными образцами

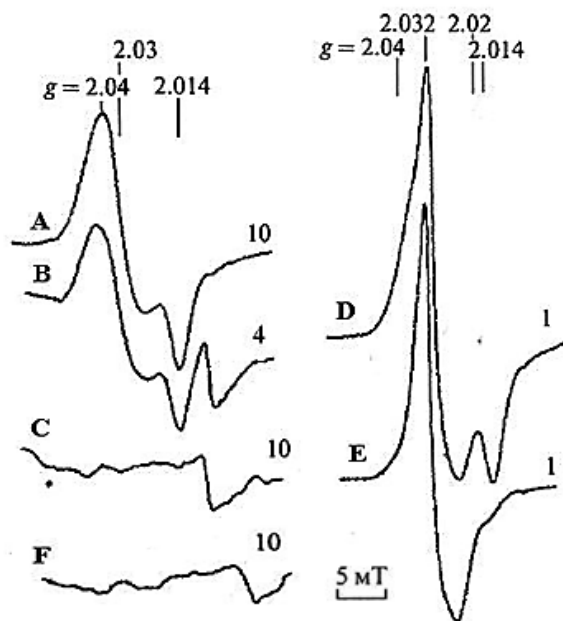
Исходя из полученных результатов, было логично предположить, что совместное использование NO-индукторов с NaHS/Na<sub>2</sub>S будет значительно повышать эффективность снижения продуктивности формирования и увеличивать показатели дисперсии биопленок. Изучение биопленок производилось на модельном организме для исследования, *P. aeruginosa* PA103 (клинический изолят, лабораторная коллекция), согласно стандартному протоколу [15].

Так при обработке клеток *P. aeruginosa* NO-индукторами в ранее установленных оптимальных концентрациях продуктивность формирования биопленки снижалась в 1.5-2.5 раза, что превосходило эффект фторхинолонового антибиотика ципрофлоксацина (позитивный контроль). Обработка клеток 0,01–0,1 мМ NaHS/Na<sub>2</sub>S не повлияла на продуктивность образования биопленки. В случае комбинированной обработки с NaHS наблюдали еще большее снижение продуктивности формирования биопленок (рис. 6), при чем данная закономерность также наблюдалась при ранее установленных оптимальных соотношениях NOd:NaHS для экспрессии генов *soxS* и *sfiA*, что также подтверждает взаимосвязь данных процессов.

При оценке влияния ранее установленных оптимальных доз NOd на суточные биопленки *P. aeruginosa* в комбинации с NaHS в ранее определенных соотношениях (рис. 7). Было зарегистрировано значительное



**Рисунок 7.** Показатели дисперсии суточных биопленок *P. aeruginosa* после 6-часовой инкубации с чистыми NO-донорами и комбинацией NOd+NaHS. Данные представляют собой средние значения; полосы ошибок указывают стандартные отклонения (n=4); \*-P ≤ 0,1; \*\*-P ≤ 0,01; \*\*\*-P ≤ 0,001-статистически незначимые различия по сравнению с необработанными контрольными образцами или между различными образцами



**Рисунок 8.** ЭПР спектры клеток *E. coli* TN530 [soxR::lacZ], инкубированных в жидкой среде LB при соответствующей обработке: А – 0,05 мМ NOdII; В – 0,01 мМ NOdII; С – контроль; D – 0,05 мМ NOdII + 0,5 мМ Na<sub>2</sub>S; E – 0,01 мМ NOdII + 0,1 мМ Na<sub>2</sub>S; F – 0,5 мМ Na<sub>2</sub>S. Спектры ЭПР регистрировали при 77 К. Усиление сигнала спектрометра (относительные единицы) показано справа

увеличение дисперсии зрелых биопленок, что еще раз указывает на то, что процессы первичного прикрепления и дисперсии зрелой биопленки регулируются одинаковыми молекулярными путями, как следствие, H<sub>2</sub>S-опосредованная медиация NO-сигнальной активности снижает продуктивность формирования биопленок, так и стимулирует рассеивание зрелой биопленки.

Увеличение экспрессии гена *soxS* и снижение продуктивности формирования биопленки при совместной обработке NOd с NaHS/Na<sub>2</sub>S, коррелировало с ростом количества белков, содержащих в своем составе ДНКЖ с перисульфидными лигандами, определение которых осуществлялось с помощью метода ЭПР-спектроскопии. В клетках обработанных NO-донорами наблюдали сигнал ЭПР ДНКЖ с тиоловыми лигандами с  $g_{aver} = 2,03$  ( $g_{\perp} = 2,04$ ,  $g_{\parallel} = 2,014$ ; рис. 8 А,В). При обработке клеток комбинацией NOd+ NaHS/Na<sub>2</sub>S (1:20) происходило изменение сигнала на “узкий” сигнал ДНКЖ с перисульфидными лигандами с  $g_{aver} = 2,03$  ( $g_{\perp} = 2,032$ ,  $g_{\parallel} = 2,02$ ; рис. 8 D,E), при этом интенсивность была в два раза больше, чем у тиола. Механизмы, лежащие в основе формирования таких “узких” сигналов в спектрах ЭПР, подробно обсуждались в работе [16].

Итак, установлено, что увеличение экспрессии гена *soxS* и снижение продуктивности формирования биопленок в результате комбинированной обработки NO+NaHS/H<sub>2</sub>S опосредуемо образованием в клетке ДНКЖ с персульфидными лигандами, а не как в случае монообработки NO-донорами – с тиоловыми. Предполагается, что активность таких комплексов выше, чем активность ДНКЖ с тиоловыми лигандами. Выдающиеся антиоксидантные свойства NO обусловлены именно его способностью связываться с клеточным железом, которое играет ключевую роль в сигнальном процессе с продукцией ДНКЖ и в опосредованной АФК токсичности при обработке биопленок: в обоих случаях NO является важным фактором окружающей среды [17].

Действительно, подробная химическая природа перекрестного взаимодействия между сульфидом и ДНКЖ в настоящее время остается неясной, но особое внимание уделяется двум химическим продуктам- нитрозотиолу HSNO и нитрозоперсульфиду SSNO<sup>-</sup>, что объясняет устойчивую биоактивности S-нитрозотиолов после реакции с сульфидом [18-20].

Так, H<sub>2</sub>S, в отличие от NO, не действует как типичная сигнальная молекула у бактерий. Он взаимодействует с истинными сигналами NO, чтобы обеспечить механизмы NO-сигнализации для оптимизации контроля проблем со стрессом. Таким образом можно заключить, что сероводород выступает медиатором NO-сигнальной активности за счет образования более активных ДНКЖ с персульфидными лигандами в клетке, что, в свою очередь, также способствует снижению уровня окислительного стресса [21] и понижению продуктивности формирования и увеличения показателей дисперсии биопленок.

Таким образом, способность H<sub>2</sub>S модулировать NO-сигнальную активность может быть использована в качестве крайне перспективной стратегии борьбы с биопленочными инфекциями при использовании NO-доноров в качестве агентов регуляции формирования и дисперсии биопленок.

#### Список литературы / References:

1. Davies D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat. Rev. Drug Discov*, 2003, vol. 2, no. 2, pp. 114-122. doi: 10.1038/nrd1008
2. Macia M., Del Pozo J., Diez-Aguilar M., Guinea J. Microbiological diagnosis of biofilm-related infections. *Diagnóstico microbiológico de las infecciones relacionadas con la formación de biopelículas. Enferm Infecc Microbiol Clin (Engl Ed)*, 2018, vol. 36, no. 6, pp. 375-381. doi: 10.1186/s12951-016-0246-1
3. Barraud N., Schleheck D., Klebensberger J., Webb J., Hassett D., Rice S., Kjelleberg S. Nitric oxide signaling in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms mediates phosphodiesterase activity, decreased cyclic di-GMP levels, and enhanced dispersal. *J Bacteriol*, 2009, vol. 191, no. 23, pp. 7333-7342. doi: 10.1128/JB.00975-09
4. Ding H., Dimple B. Direct nitric oxide signal transduction via nitrosylation of iron-sulfur centers in the SoxR transcription activator. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 2000, vol. 97, no. 10, pp. 5146-5150.
5. Lee S.J., Kim D.G., Lee K.Y., Koo J.S., Lee B.J. Regulatory mechanisms of thiol-based redox sensors: lessons learned from structural studies on prokaryotic redox sensors. *Arch Pharm Res.*, 2018, vol. 41, no. 6, pp. 583-593. doi:10.1007/s12272-018-1036-0
6. Lobysheva I.I., Stupakova M.V., Mikoyan V.D., Vasilieva S.V., Vanin A.F. Induction of the SOS DNA repair response in *Escherichia coli* by nitric oxide donating agents: dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands and S-nitrosothiols. *FEBS Lett*, 1999, vol. 454, no. 3, pp. 177-180. doi:10.1016/s0014-5793(99)00777-2
7. Vasilieva S.V., Stupakova M.V., Lobysheva I.I., Mikoyan V.D., Vanin A.F. Activation of the *Escherichia coli* SoxRS-regulon by nitric oxide and its physiological donors. *Biochemistry (Mosc)*, 2001, vol. 66, no. 9, pp. 984-988. doi:10.1023/a:1012317508971
8. Kim S.K., Lee J.H. Biofilm dispersion in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Microbiol*, 2016, vol. 54, no. 2, pp. 71-85. doi:10.1007/s12275-016-5528-7
9. Emel'yanova N.S., Shmatko N.Yu., Sanina N.A. Experimental and quantum-chemical simulation of pH-medium effects on the NO-donor activity of mononuclear nitrosyl iron complex [Fe(SC(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>)<sub>2</sub>(NO)<sub>2</sub>]<sup>-1</sup> · H<sub>2</sub>O. *Izv. Akad. Nauk. Ser. Khim.*, 2015, no. 10, pp. 2344-2350.
10. Aldoshin S.M., Sanina N.A., Davydov M.I. A new class of nitric oxide donors. *Her. Russ. Acad. Sci.*, 2016, vol. 86, pp. 158-163. doi: 10.1134/S1019331616030096
11. Tinajero-Trejo M., Jesse H., Poole R. Gasotransmitters, poisons, and antimicrobials: it's a gas, gas, gas! *F1000Prime Rep.*, 2013, vol. 5, no. 28. doi:10.12703/P5-28
12. Scammahorn J.J., Nguyen I., Bos E.M., Van Goor H., Joles J.A. Fighting Oxidative Stress with Sulfur: Hydrogen Sulfide in the Renal and Cardiovascular Systems. *Antioxidants (Basel)*, 2021, vol. 10, no. 3. doi: 10.3390/antiox10030373
13. Lloyd D. Hydrogen sulfide: clandestine microbial messenger? *Trends Microbiol.*, 2006, vol. 14, no. 10, pp. 456-462.
14. Miller J. Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harb. *Lab. Press.*, 1972.
15. Васильева С.В., Стрельцова Д.А., Старостина И.А., Санина Н.А. Оксид азота участвует в регуляции сборки Fe-S-кластеров белков и формировании биопленок клетками *Escherichia coli*. *Известия Российской академии наук. Серия биологическая. Академическая наука*, 2013, № 4, с. 398-404. [Vasilyeva S.V., Streltsova D.A., Starostina I.A., Sanina N.A. Nitric oxide participates in the regulation of the assembly of Fe-S-clusters of proteins and the formation of biofilms by *Escherichia coli* cells. *Izvestiya Rossiiskoi Akademii Nauk. Seriya biologicheskaya*, 2013, vol. 4, pp. 398-404. (In Russ.)]

16. Vanin A.F. et al. EPR Characterization of mononuclear dinitrosyl iron complex with persulfide as a new representative of dinitrosyl iron complexes in biological systems: An Overview. *Appl. Magn. Reson.*, 2014, vol. 45, no. 4, pp. 375-387.
17. Vanin A.F. Nitric Oxide Dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands as a “working form” of endogenous nitric oxide. *Nitric Oxide*, 2016, vol. 54, pp. 15-29. doi: 10.1016/j.niox.2016.01.006
18. Whiteman M., Li L., Kostetski I., Chu S.H., Siau J.L., Bhatia M., Moore P.K. Evidence for the formation of a novel nitrosothiol from the gaseous mediators nitric oxide and hydrogen sulphide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2006, vol. 343, no. 1, pp. 303-310. doi: 10.1016/j.bbrc.2006.02.154
19. Dillon K.M., Carrazzone R.J., Matson J.B., Kashfi K. The evolving landscape for cellular nitric oxide and hydrogen sulfide delivery systems: A new era of customized medications. *Biochem Pharmacol.*, 2020, vol. 176, 113931. doi: 10.1016/j.bcp.2020.113931
20. Ozfidan-Konakci C., Yildiztugay E., Elbasan F., Kucukoduk M., Turkan I. Hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) and nitric oxide (NO) alleviate cobalt toxicity in wheat (*Triticum aestivum* L.) by modulating photosynthesis, chloroplastic redox and antioxidant capacity. *J. Hazard Mater.*, 2020, vol. 388, 122061. doi: 10.1016/j.jhazmat.2020
21. Shatalin K., Shatalina E., Mironov A., Nudler E. H<sub>2</sub>S: a universal defense against antibiotics in bacteria. *Science*, 2011, vol. 334, no. 6058, pp. 986-990. doi: 10.1126/science.1209855

## HYDROGEN SULFIDE MEDIATES NO-SIGNALING ACTIVITY, THEREBY STIMULATING BIOFILM DISPERSION

Telegina D.I.<sup>1,2</sup>, Vasilieva S.V.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>D. Mendeleev University of Chemical Technology of Russia  
Miuskaya square, 9, Moscow, 125047, Russia; e-mail: daryakinder62@gmail.com

<sup>2</sup>I.M. Sechenov First Moscow State Medical University  
Trubetskaya st., 8, Moscow, 119991, Russia

<sup>3</sup>Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences  
Kosygina st., 4, Moscow, 117977, Russia; e-mail: svvs0709@mail.ru

**Abstract.** In this study we first took an integrated approach to the interaction of NO and H<sub>2</sub>S gases, produced by the bacterial cells within their signaling potencies in DNA repair responses to oxidative damages and control of bacterial biofilm production. In the study of crystalline nitrosyl iron complexes, it was found that combined treatment with an NO donor and hydrogen sulfide, under the condition of a 2.5-fold excess of H<sub>2</sub>S for each NO-donor group, stimulates an increase in NO-signaling activity due to the formation of more active DNICs with persulfide ligands in the cell, which, in contrast to DNIC with thiol ligands, give a characteristic “narrow” EPR signal with  $g_{\text{aver}} = 2.03$  ( $g_{\perp} = 2.032$ ,  $g_{\parallel} = 2.02$ ). Thereby, H<sub>2</sub>S acts as a mediator of NO signaling activity, thereby stimulating a significant increase in the level of soxS gene expression. The effect of the combined treatment on the level of sfiA gene expression was not found. This phenomenon causes a decrease in the level of oxidative stress during joint treatment with a NO donor and H<sub>2</sub>S, which has a significant effect on a decrease in the productivity of biofilm formation (on average by 30% relative to mono-treatment) and an increase in the dispersion indicators of mature biofilms (on average by 25% relative to mono-treatment). We suppose that our findings with the complex NO-donors with H<sub>2</sub>S application may be useful in solving the bacterial biofilm problems.

**Key words:** nitric oxide, hydrogen sulfide, biofilm, signaling functions.