

УДК 577.158.54

## БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АДЕНОЗИН-5'-ТРИФОСФАТА, ВЫТЕКАЮЩЕГО ИЗ КЛЕТОК ДРОЖЖЕЙ ПРИ ИХ ФОТОДИНАМИЧЕСКОМ ПОВРЕЖДЕНИИ

Н. А. Романова, Е. В. Пометун, А. П. Савицкий, Н. Н. Угарова\*

(кафедра энзимологии химического факультета Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова; Воробьевы горы, Москва 119899, Россия; факс: (095) 939-54-17; e-mail: UNN@enz.chem.msu.ru)

Изучено вытекание аденозин-5'-трифосфата (АТФ) из клеток дрожжей при их фотодинамическом повреждении в присутствии фотосенсибилизатора димигина (2,4-ди( $\alpha$ -метоксиэтил)-дейтеропорфирина IX). В отсутствие димигина вытекания АТФ не происходит. Получены зависимости концентрации вытекающего АТФ ( $(\text{АТФ})_{\text{out}}$ ) от концентрации димигина, времени темновой предынкубации клеток с димигином, от дозы и мощности света. Определены оптимальные условия фотодинамического воздействия, при которых концентрация  $(\text{АТФ})_{\text{out}}$  пропорциональна количеству клеток. Димигин не оказывает фотодинамического воздействия на клетки *E. coli*, но повреждает клетки дрожжей в смеси с *E. coli*, что указывает на возможность селективного определения клеток микроорганизмов по количеству АТФ, вытекающего из клеток при фотодинамическом воздействии.

Одним из наиболее быстрых и высокочувствительных методов определения общей бактериальной зараженности различных объектов является биоломинесцентная АТФ-метрия, когда по концентрации внутриклеточного аденозин-5'-трифосфата (АТФ) определяют количество клеток. Предварительно микробные клетки разрушают различными химическими агентами (кислоты, органические растворители, поверхностно-активные вещества) и измеряют перешедший в раствор АТФ с помощью люциферин-люциферазных реагентов [1]. Селективность определения микробных загрязнений биоломинесцентным методом может быть достигнута при использовании либо специфических сред для наращивания микробных клеток определенного вида, либо селективных методов высвобождения внутриклеточного АТФ. Известны фотодинамические методы разрушения клеток, основанные на процессе фотосенсибилизации – передачи энергии от сенсибилизатора, возбуждаемого видимым (преимущественно красным) светом, к молекуле кислорода, в результате чего образуется синглетно возбужденный кислород [2], обладающий высокой реакционной способностью. Генерация синглетного кислорода происходит в месте локализации возбуждаемых светом молекул сенсибилизатора, который, как правило, адсорбируется на клеточных мембранах. Последние и являются главной мишенью фотодинамического воздействия [3]. Увеличение проницаемости мембран приводит к повреждению и в конце концов к гибели клеток. Антимикробный эффект таких фотоактивируемых соединений, как порфирины и фталоцианины, описан для различных штаммов микроорганизмов [4–10]. Для некоторых из них обнаружена селективность действия на грамположительные или грамотрицательные бактерии [8, 9]. Поскольку фотодинамическое

воздействие приводит к увеличению проницаемости клеточных мембран для внутриклеточных метаболитов, то следовало ожидать, что такой метаболит, как АТФ, при фотодинамическом повреждении также будет вытекать во внеклеточную среду, где его можно измерять биоломинесцентным методом. Подбор фотосенсибилизаторов, селективно адсорбирующихся на различных типах клеточных мембран, позволил бы определять одни микроорганизмы на фоне других, т. е. сделал бы метод биоломинесцентной АТФ-метрии селективным.

Целью настоящей работы являлось выяснение возможности использования фотодинамического воздействия на клетки как альтернативного метода экстракции внутриклеточного АТФ в биоломинесцентной АТФ-метрии. В качестве модельной культуры были использованы клетки дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, а в качестве сенсибилизатора – димигин.

### Материалы и методы

Использовали бульонные культуры микробных клеток *Saccharomyces cerevisiae* и *E. coli*, аденозин-5'-трифосфат (АТФ) («Reanal», Венгрия), димигин (2,4-ди( $\alpha$ -метокси-этил)дейтеропорфирин IX) (Институт биомедицинской химии РАМН), свежеперегранный диметилсульфоксид (DMSO), неорганические соли «х.ч.» («Sigma», США), АТФ-реагент ИММОЛЮМ [1], содержащий иммобилизованную люциферазу светлячков, D-люциферин,  $\text{MgCl}_2$ . Интенсивность биоломинесценции регистрировали на люминометре 3550i («New Horizons», США). Все манипуляции с микроорганизмами, за исключением облучения, проводили в ламинаре GS («Babcock», Германия). Культивирование микроорганизмов проводили в термостатируемой качалке Certomat («B. Braun», Германия).

\*Адресат для переписки.

Облучение клеток проводили на лабораторной установке, состоящей из лампы накаливания, водяного фильтра, поглощающего УФ-излучение, красного фильтра ОС-14 и световолоконного кабеля (площадь сечения 25 мм<sup>2</sup>). Величину мощности излучения определяли на измерителе ИМО-2Н.

**Получение и очистка биомассы.** Запасный замороженный в 40%-м глицерине порциями по 0,5 мл титр клеток помещали в 5 мл жидкой питательной среды, инкубировали в течение 10–12 ч (37°, 140 об/мин), отбирали 0,5 мл культуры, помещали в 5 мл свежей питательной среды и инкубировали в условиях, описанных выше, в течение 2–3 ч до достижения требуемой оптической плотности (при 590 нм) суспензии. Для использования в дальнейшей работе пробу суспензии клеток отмывали буферным раствором от питательной среды путем двукратного центрифугирования (2500 об/мин, 10 мин).

**Фотодинамическое воздействие на клетки.** Суспензию клеток разделяли на три образца, в два из которых добавляли димигин в концентрации от 10 до 100 мкг/мл. Образцы инкубировали в темноте при постоянном перемешивании в течение 0–115 мин. Затем один из образцов, содержащих димигин, помещали в кювету (250 мкл) и освещали красным (фильтр ОС-14) или белым светом мощностью 0,005–0,033 Вт в течение 3–15 мин. Площадь облучаемой поверхности составляла ≈25 мм<sup>2</sup>. Два других образца использовали в качестве контрольных. Измеряли концентрацию внеклеточного АТР во всех трех образцах (см. ниже) и рассчитывали концентрацию вытекшего АТР ([АТР]<sub>out</sub>) в измеряемом образце как разницу концентраций АТР в облученном и контрольных образцах. Концентрация внеклеточного АТР в контрольных образцах отличалась от нулевой из-за присутствия примеси АТР в буферном растворе и из-за частичной засветки контрольного образца, содержащего димигин. Параллельно измеряли общую концентрацию АТР ([АТР]<sub>total</sub>) в образце после добавления к аликвоте 10-кратного избытка DMSO. Концентрацию внутриклеточного АТР определяли как разницу концентраций (АТР)<sub>total</sub> и (АТР)<sub>out</sub>.

**Измерение концентрации АТР.** Во флакон с лиофилизированным АТР-реагентом ИММОЛЮМ добавляли 10 мл деионизированной воды, выдерживали при комнатной температуре 12 ч для снижения фонового свечения. Запасный 1 мМ раствор АТР-стандарта в деионизированной воде готовили по точной навеске и замораживали порциями по 0,5 мл. Перед измерением порцию размораживали, разбавляли деионизированной водой до концентрации 1 мкМ и хранили во льду, используя полученный раствор АТР-стандарта в течение 2–3 ч. Для измерения концентрации АТР в кювету люминометра вносили 150 мкл АТР-реагента, встряхивали, измеряли фоновый сигнал I<sub>1</sub>, добавляли 50 мкл образца (при измерении внеклеточного АТР) или 50 мкл полученного экстракта в DMSO (при измерении общего АТР), вновь встряхивали и измеряли сигнал образца I<sub>2</sub>. Затем добавляли 10 мкл раствора АТР-стандарта, встряхивали и измеряли сигнал I<sub>3</sub>. Концентрацию АТР ([АТР], мкМ) рассчитывали по формуле

$$[АТР], мкМ = \frac{(I_2 - I_1)}{(I_2 - I_3)} \cdot K, \text{ где } K = 0,19 \text{ для } (АТР)_{out} \text{ и } 1,9 \text{ для } (АТР)_{total}.$$

### Результаты и обсуждение

**Влияние условий фотодинамического воздействия на концентрацию вытекающего из клеток дрожжей АТР.** Освещение красным светом (доза 6,6 и 19,8 Дж) суспензии клеток дрожжей, не содержащей димигина, не влияло на общую концентрацию АТР и не увеличивало, а даже несколько снижало концентрацию внеклеточного АТР независимо от дозы, что может объясняться частичным гидролизом свободного АТР. Следовательно, в отсутствие димигина освещение клеток не вызывает вытекания АТР из клеток дрожжей. Одним из существенных факторов, влияющих на фотодинамический эффект, является длительность темновой прединкубации клеток с сенсibilизатором, т.е. время достижения наиболее эффективной концентрации последнего на поверхности клеток в результате адсорбции, что может также влиять и на концентрацию вытекающего из клеток АТР. Для выяснения этого вопроса освещению подвергали образцы, предварительно инкубированные в темноте с димигином в течение 0 – 115 мин. При времени прединкубации 0–17 мин не наблюдали вытекания АТР, при 17–55 мин концентрация (АТР)<sub>out</sub> росла линейно с увеличением длительности прединкубации, достигала постоянной величины и далее не изменялась при увеличении длительности прединкубации до 80 мин, а затем начинала уменьшаться. Рост концентрации (АТР)<sub>out</sub> с увеличением длительности темновой прединкубации можно объяснить тем, что адсорбционное равновесие димигин (раствор) ↔ димигин (мембрана) достигается не мгновенно, а в течение некоторого времени. После достижения этого равновесия фотодинамический эффект сохраняется постоянным, а дальнейшее его падение скорее всего связано с более глубоким повреждением клеток, при котором высвобождаются АТР-гидролизующие ферменты. Данное уменьшение концентрации (АТР)<sub>out</sub> не может быть результатом частичной гибели клеток, так как в процессе инкубации концентрация (АТР)<sub>total</sub> практически не меняется. Наиболее высокая концентрация (АТР)<sub>out</sub> достигается при длительности прединкубации в темноте 55–80 мин. Концентрация сенсibilизатора оказывает большое влияние на фотодинамический эффект. С ее увеличением растет концентрация (АТР)<sub>out</sub> и достигает максимального значения при содержании сенсibilизатора

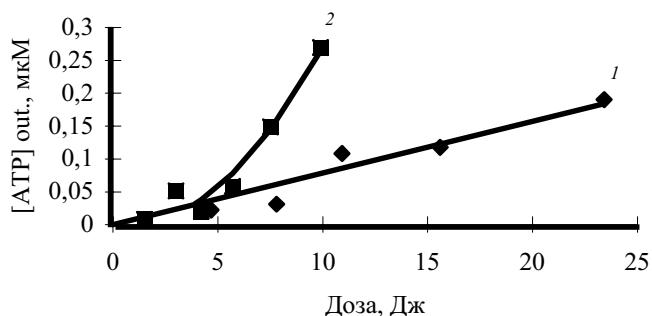


Рис. 1. Зависимость концентрации (АТР)<sub>out</sub> для клеток дрожжей при их фотодинамическом повреждении от дозы красного света: 1 – при фиксированной мощности (0,026 Вт) и разном времени экспозиции (3–15 мин); 2 – при фиксированной экспозиции (3 мин) и разной мощности (0,008–0,055 Вт)

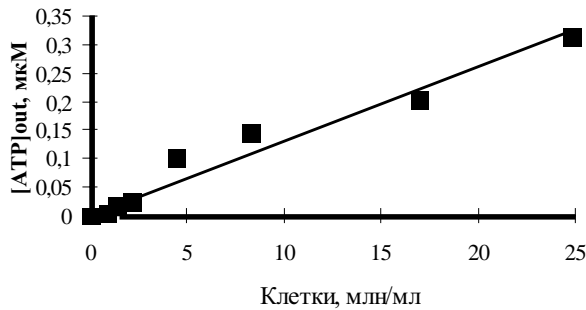


Рис. 2. Зависимость концентрации  $(ATP)_{out}$  для клеток дрожжей при их фотодинамическом повреждении от количества клеток в исходном образце. Доза облучения 7,8 Дж, экспозиция 5 мин, время темновой инкубации с 50 мкг/мл димигина 60 мин

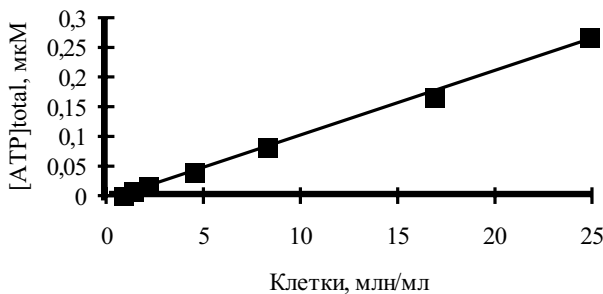


Рис. 3. Зависимость концентрации  $(ATP)_{total}$  для клеток дрожжей при их фотодинамическом повреждении от количества клеток в исходном образце. Приведены результаты измерений АТР для экстракта клеток с помощью DMSO. Условия см. в подписи к рис. 2

50 мкг на 1 мл образца. Таким образом, оптимальная концентрация димигина составила 50 мкг на 1 мл образца.

Доза прилагаемого облучения должна оказывать существенное влияние на концентрацию  $(ATP)_{out}$ . Увеличение дозы может быть достигнуто либо путем варьирования мощности источника света при постоянной длительности освещения, либо изменением его длительности при постоянной мощности света. Зависимость концентрации  $(ATP)_{out}$  от дозы, когда мощность сохранялась постоянной (0,026 Вт), а увеличение дозы достигалось путем увеличения длительности облучения от 3 до 15 мин (рис. 1, кривая 1) была линейной. Когда же доза возрастала при увеличении мощности источника света от 0,008 до 0,055 Вт при постоянной длительности облучения (3 мин), то получали сложную зависимость концентрации  $(ATP)_{out}$  от дозы (рис. 1, кривая 2). При дозе до 4,5 Дж концентрация  $(ATP)_{out}$  линейно зависела от дозы и кривые 1 и 2 совпадали. При дозах, превышающих 4,5 Дж, зависимость концентрации  $(ATP)_{out}$  описывалась не линейной, а квадратичной зависимостью. Наблюдаемое явление можно объяснить тем, что при коротких временах облучения и высокой мощности света клетка «не успевает» включить механизмы репарации, препятствующие потере АТР. При меньшей мощности и более длительной экспозиции клетка, возможно, частично восстанавливает целостность

мембраны и активность АТР-синтезирующей системы. Следовательно, для достижения максимального эффекта вытекания АТР при фотодинамическом воздействии освещение следует проводить при непродолжительной экспозиции, но высокой мощности источника света.

Длина волны источника света – еще одна характеристика, которая может оказывать влияние на фотодинамический эффект, однако освещение клеток как красным (620–700 нм), так и белым (400–700 нм) светом не влияло на фотодинамический эффект. Известно, что в зависимости от фазы роста клеток содержание их внутриклеточного АТР несколько меняется [1]. Так, при переходе от логарифмической фазы к стационарной содержание внутриклеточного АТР немного снижается. При фотодинамическом воздействии на клетки, находившиеся в позднем стационаре ( $A_{590} = 3,75$ ), концентрация  $(ATP)_{out}$  мало отличалась от концентрации  $(ATP)_{out}$  для клеток, находившихся в логарифмической фазе роста. Следовательно, концентрация  $(ATP)_{out}$  почти не зависит от фазы роста клеток. Таким образом, проведенные исследования показали, что оптимальными условиями фотодинамического воздействия на клетки дрожжей являются: 50 мкг/мл димигина, 60 мин темновой прединкубации, освещение красным светом дозой 7,8 Дж.

Зависимость концентрации  $(ATP)_{out}$  от количества клеток в образце. Для выяснения возможности определения клеток биолюминесцентным методом по концентрации  $(ATP)_{out}$  при их фотодинамическом повреждении была получена зависимость концентрации  $(ATP)_{out}$  от количества клеток в исходном образце (рис. 2). Для этого из постоянно растущей культуры дрожжей через определенные промежутки времени отбирали пробы клеток, подвергали фотодинамическому воздействию в оптимальных условиях, указанных выше, и измеряли концентрации  $(ATP)_{out}$  и  $(ATP)_{total}$ . На рис. 2 показана линейная зависимость концентрации  $(ATP)_{out}$  от содержания клеток в исходном образце, которая описывается уравнением

$$y = 0,0131x \quad (R^2 = 0,96).$$

Зависимость концентрации  $(ATP)_{total}$  экстрагированного с помощью DMSO, от количества клеток в исходном образце показана на рис. 3. Эта зависимость описывается линейным уравнением вида

$$y = 0,011x - 0,0076 \quad (R^2 = 0,99).$$

В первом случае (рис. 2) измеряли АТР в исходной суспензии клеток, а во втором (рис. 3) – в суспензии, разбавленной в 10 раз добавлением ДМСО для экстракции внутриклеточного АТР. Использованный в работе

**Концентрация  $(ATP)_{out}$  для клеток *E. coli* и для их смеси с дрожжами *Saccharomyces cerevisiae* после фотодинамического воздействия разными дозами света**

Состав образца	Концентрация $(ATP)_{out}$ , мкМ	
	Доза 7,8 Дж	Доза 9,6 Дж
Клетки <i>E. coli</i>	0	0
Клетки <i>E. coli</i> + <i>S. cerevisiae</i> (смесь 1:1)	0,04	0,06

АТФ-реагент имел нижний предел обнаружения АТФ, равный 0,001 мкМ. Для зависимости, показанной на рис. 2, это соответствует содержанию клеток в исходном образце 76 000 кл/мл, а для зависимости, показанной на рис. 3, – 780 000 кл/мл. Таким образом, при экстракции внутриклеточного АТФ с помощью DMSO нижний предел обнаружения клеток методом АТФ-метрии почти в 10 раз выше, чем при использовании фотодинамического метода высвобождения внутриклеточного АТФ.

*Селективное определение клеток дрожжей в присутствии грам-отрицательных микроорганизмов (клеток *E. coli*).* В литературе имеются данные об устойчивости грамотрицательных микроорганизмов к фотодинамической деструкции в присутствии димигина [8, 10]. В связи с этим мы выяснили возможность селективного оп-

ределения дрожжевых клеток в присутствии грамотрицательных микроорганизмов *E. coli* по концентрации  $(\text{АТФ})_{\text{out}}$  при фотодинамическом воздействии на смесь клеток. В качестве исследуемых образцов использовали бульонную культуру *E. coli* как в чистом виде, так и в смеси с культурой дрожжей. Результаты этих опытов (таблица) показывают, что освещение клеток *E. coli* в оптимальных условиях, использованных в данной работе, не приводит к вытеканию внутриклеточного АТФ. Для смеси клеток концентрация  $(\text{АТФ})_{\text{out}}$  значительно отличается от нуля и увеличивается с ростом дозы облучения. Это показывает возможность селективного определения клеток дрожжей на фоне грамотрицательных микроорганизмов *E. coli* при фотодинамическом воздействии на смеси клеток в присутствии димигина.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Угарова Н.Н. // Прикл. биохим. микробиол. 1993. **29**. С. 180.
2. Фум Х. // Свободные радикалы в биологии. М., 1979. **2**. С. 96.
3. Ito T. // Studia biophys. 1983. **94**. P. 1.
4. Malik Z., Hanania J., Nitzan Y. // Photochem. Photobiol. 1990. **5**. P. 281.
5. Bertoloni G., Salvato B., Dall'Acqua M., Vazzoler M., Jory G. // Photochem. Photobiol. 1984. **39**. P. 811.
6. Millson Ch., Wilson M., MacRobert A., Thurrell W., Mikvy P., Davies C., Bown S. // Proc. SPIE. 1994. **2325**. P. 17410.
7. Wainwright M. // J. Antimicrob Chemother. 1998. **42**. P. 13.
8. Bertoloni G., Dall'Acqua M., Vazzoler M., Salvato B., Jory G. Porphyrins in tumor phototherapy. N.Y., 1983. P. 177.
9. Ito T. // Photochem. Photobiol. 1981. **34**. P. 521.
10. Bancirova M., Lasovsky J., Kolarova H., Frebortova J., Medkova J. Bioluminescence and chemiluminescence. N.Y., 1999. P. 567.

Поступила в редакцию 20.06.00