

## Задача

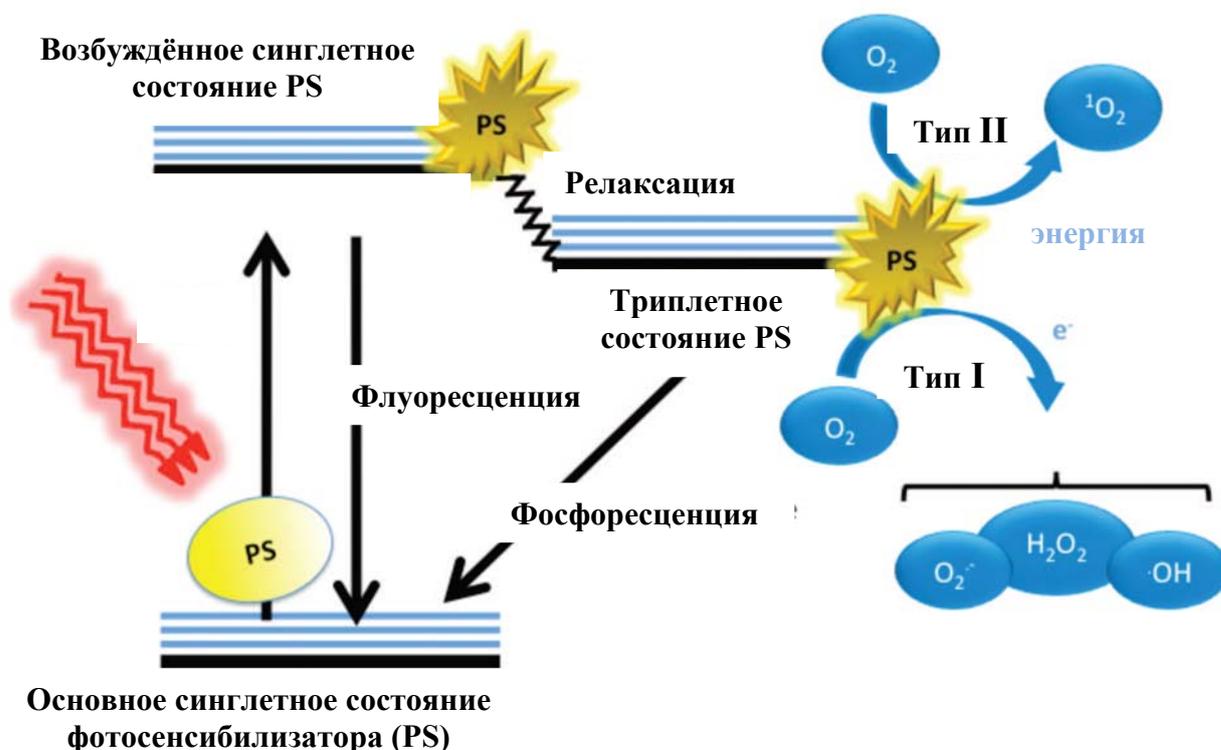
### Изучение фотодинамической инактивации бактерий биолюминесцентным методом

Страховская М.Г., Беленикина Н.С.

#### Аннотация задачи

Фотодинамическая инактивация микроорганизмов, в основе которой лежат цитотоксические свойства активных форм кислорода (АФК), генерируемых красителями-фотосенсибилизаторами в фотовозбуждённом состоянии, открыта более ста лет назад. Однако лишь в последние два десятилетия исследования в этой области получили активное развитие, что обусловлено ростом антибиотикорезистентности и необходимостью разработки альтернативных способов борьбы с возбудителями инфекционных заболеваний.

При поглощении света молекула фотосенсибилизатора (PS) переходит сначала в короткоживущее синглетное, а затем, путем интеркомбинационной конверсии, в более долгоживущее триплетное возбужденное состояние. Реакции возбужденных молекул сенсибилизатора с окружающими молекулами делят на два типа:



Тип I (радикальные процессы) включает реакции непосредственного взаимодействия возбужденного фотосенсибилизатора с субстратом и/или молекулами растворителя с образованием в ходе межмолекулярного переноса электрона или атома водорода ион-радикалов и радикалов. Начальной формой активированного кислорода, образующегося в фотоокислительных процессах первого типа, является супероксид анион радикал ( $O_2^{\cdot-}$ ). Помимо наличия собственного окислительного потенциала, главная опасность  $O_2^{\cdot-}$  для живых систем заключается в генерации им других АФК, особенно, высоко реакционноспособных гидроксильных радикалов. Таким образом, в результате реакций радикалов с кислородом генерируется сложная смесь активных интермедиатов ( $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$  и  $\cdot OH$ ), вызывающих окислительную деструкцию биомолекул.

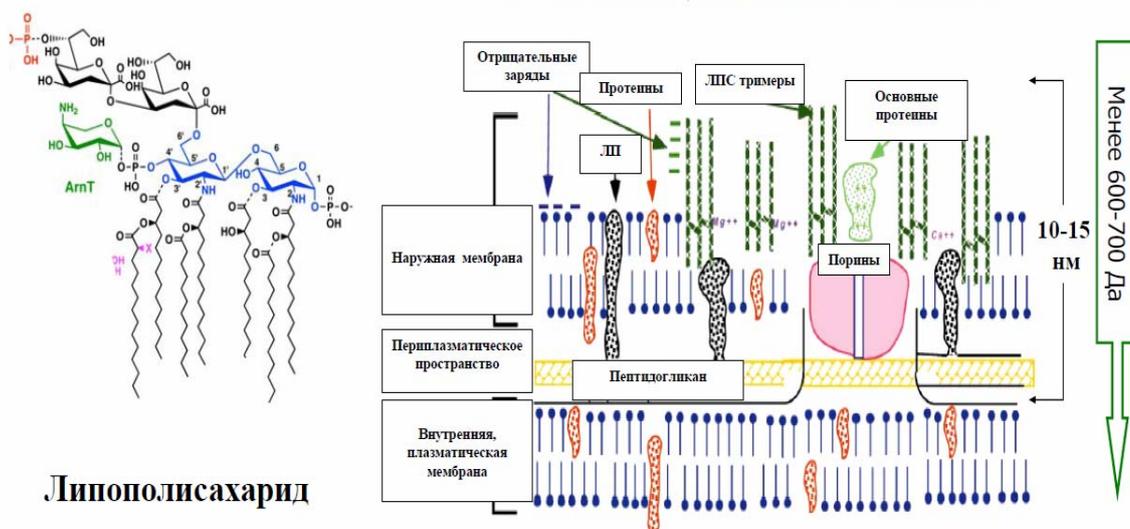
В фотодинамических реакциях, относящихся к фотоокислительным процессам II типа, происходит триплет-триплетный перенос энергии от возбужденного фотосенсибилизатора на молекулярный кислород, находящийся в основном триплетном состоянии, с образованием его синглетного возбужденного состояния  $^1\Delta_g O_2$  ( $^1O_2$ ). Реакции II типа преобладают при низких концентрациях субстратов окисления и высокой концентрации кислорода. Для протекания фотосенсибилизированных реакций II типа необходимо, чтобы энергия триплетного возбужденного состояния фотосенсибилизатора была не меньше, чем энергия образования первого синглетного состояния кислорода (94,7 кДж/моль), а время жизни  $\tau_T \geq 500$  нс. Второе синглетное состояние кислорода ( $^1\Sigma_g^+ O_2$ ) с энергией возбуждения 158 кДж/моль также может образовываться путем миграции энергии с соответствующих триплетных уровней фотосенсибилизаторов, однако оно имеет короткое время жизни (20 пс) и быстро переходит в первое синглетное состояние. Квантовый выход генерации  $^1O_2$  ( $\Phi_\Delta$ ), один из важнейших параметров при оценке потенциальной фототоксичности фотосенсибилизаторов, составляет до 0,56 (протопорфирин IX), 0,65 (фталоцианины), 0,91 (Zn-протопорфирин). К параметрам, оказывающим большое влияние на  $\Phi_\Delta$  и фотосенсибилизирующую активность, относится степень агрегации молекул фотосенсибилизатора: эффективно генерируют  $^1O_2$  только мономерные формы.

В отличие от антибиотиков, каждый из которых специфически воздействует на определенную мишень в микробной клетке: клеточную стенку,

цитоплазматическую мембрану, репликацию ДНК, транскрипцию или трансляцию белков, АФК вызывают неспецифическое повреждение всех клеточных компонентов, потенциально подверженных окислительным реакциям. Множественный характер окислительной деструкции микробных клеток-мишеней затрудняет выработку устойчивости к последующим циклам фотодинамических воздействий.

Фундаментальное различие в чувствительности грамположительных и грамотрицательных бактерий к фотосенсибилизации, связывают с принципиальными различиями в строении клеточных стенок этих двух групп бактерий. Общеизвестно, что важнейшей структурой, отвечающей за общую устойчивость грамотрицательных бактерий к различным внешним агентам (антибиотикам, детергентам, красителям), является наружная мембрана, входящая в состав клеточной стенки. В основе наружной мембраны лежит бислойная ассиметричная структура, внешний слой которой состоит преимущественно из липополисахаридов (ЛПС,  $2-3,5 \times 10^6$  молекул/клетку), которые занимают около 75% площади поверхности клетки, и встроенных между ЛПС белковых комплексов. Суммарный отрицательный заряд ЛПС связан с высоким содержанием отрицательно заряженных групп - остатками фосфорной кислоты и карбоксильными группами.

### СТРОЕНИЕ КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКИ ГРАМ-ОТРИЦАТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ



Для отбора перспективных фотосенсибилизаторов необходимо создание тест-систем, позволяющих быстро и эффективно оценивать фототоксичность

новых препаратов. В настоящей задаче фотобактерицидная активность красителей исследуется с использованием бактериальной биолюминесцентной тест-системы.

В качестве биосенсора используют генно-инженерный штамм грамотрицательных бактерий *Escherichia coli* K12 TG1, биолюминесценция которого обусловлена клонированным полным *lux*-опероном из светящихся почвенных энтомопатогенных бактерий *Photobacterium luminescens* ZM1. Измерения интенсивности биолюминесценции проводят с использованием люминометра Sirius Smart Line TL (Titertek, США). Метод основан на корреляции между тушением биолюминесценции бактерий и уменьшением в тест-культуре количества колониеобразующих единиц. Полученные результаты продемонстрируют зависимость эффективности сенсibilизированной фотодинамической инактивации бактерий от заряда молекул фотосенсibilизатора, а также концентрации неорганических катионов в буферной среде, использованной для приготовления суспензий бактерий.

**Схему постановки эксперимента можно представить следующим образом:**

Регидратация лиофилизированного биосенсора

↓

Измерение биолюминесценции,  $V_{исх}$

↓

Преинкубация с фотосенсibilизатором (ФС)

↓

Измерение биолюминесценции

«темнового» контроля,  $V_T$

«темновая» токсичность ФС =

$$100(V_{исх} - V_T) / V_{исх}$$

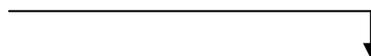
↓

Облучение

↓

Измерение биолюминесценции,  $V$

$$\text{фототоксичность} = 100(V_T - V) / V_T$$



Облучение

↓

Измерение биолюминесценции

«светового» контроля,  $V_0$

фотоиндуцированное подавление биолюминесценции без ФС =

$$100(V_{исх} - V_0) / V_{исх}$$

↓

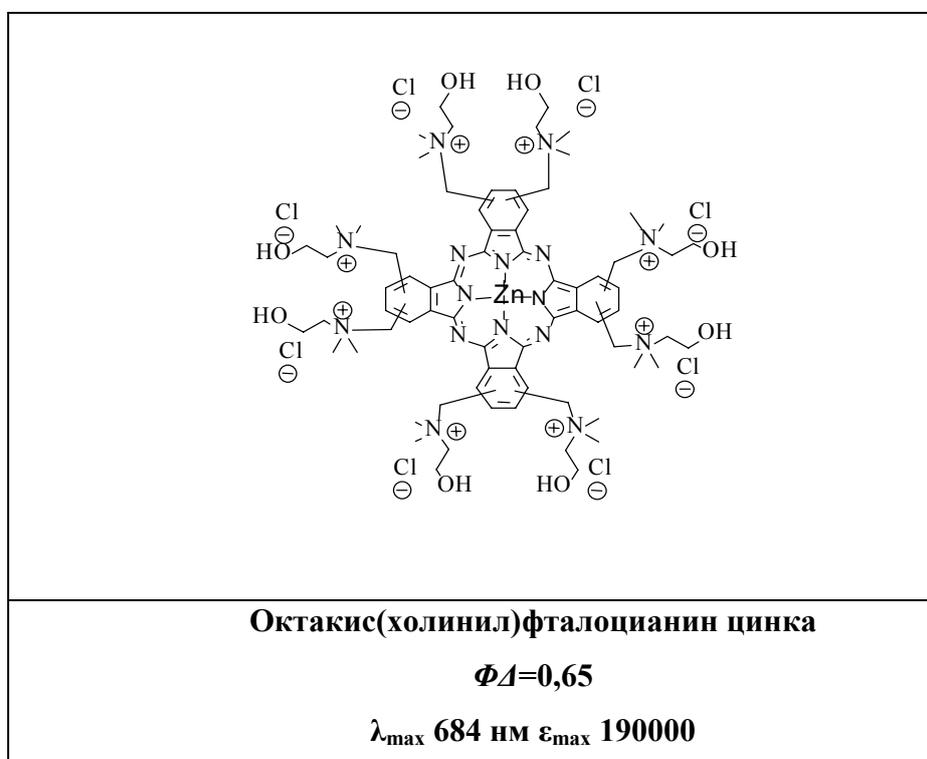
В отсутствие «темновой»

токсичности ФС

$$\text{фототоксичность} = 100(V_0 - V) / V_0$$

В работе используются фотосенсибилизаторы, молекулы которых являются одновременно генератором активных форм кислорода и несут положительно заряженные заместители, повышающие эффективность взаимодействия фотосенсибилизатора с бактериальной клеткой-мишенью. К таким фотосенсибилизаторам относятся, например, поликатионные замещенные металлофталоцианины, водорастворимые красители, с высокой эффективностью генерирующие синглетный кислород и эффективно связывающиеся с поверхностными структурами бактериальных клеток.

Фталоцианины цинка относят к фотосенсибилизаторам типа II, механизм действия которых включает образование цитотоксического синглетного кислорода ( $^1O_2$ ).



Модификация химической структуры путем введения положительно заряженных периферических заместителей ведет как к изменению физико-химических и фотофизических свойств – уменьшению степени агрегации в растворах, увеличению квантового выхода генерации синглетного кислорода ( $\Phi\Delta$ ), так и появлению новых свойств во взаимодействии с биообъектами – способности взаимодействовать с отрицательно заряженными поверхностными структурами бактериальных клеток. Последующее проникновение красителя внутрь клетки осуществляется путем самооблегченного транспорта. Молекулы

фотосенсибилизатора, связанные или прошедшие через наружную мембрану клеточной стенки, опосредуют при облучении фотоокислительную деструкцию плазматической мембраны и лизис бактериальных клеток.

**Цель задачи:** освоение биолюминесцентного метода для тестирования фотодинамической активности красителей в отношении грамотрицательных бактерий.

**Объекты исследования:** генно-инженерный биолюминесцентный штамм грамотрицательных бактерий *Escherichia coli* K12 TG1.

**Реактивы:** октакис(холинил)фталоцианин цинка, PBS буферы с высокой (135 мМ) и низкой (15 мМ) концентрацией солей.

**Методы:** биолюминесцентный метод

**Оборудование:**

- 1) Люминометр Sirius Smart Line TL (Titertek, USA)
- 2) Светодиодный источник дальнего красного света (12,5 мВт/см<sup>2</sup>).

**План работы:**

1. Подготовка суспензии бактерий в дистиллированной воде и PBS с высокой (135 мМ) и низкой (15 мМ) концентрацией солей.
2. Определение интенсивности биолюминесценции суспензий бактерий до и после инкубации с фотосенсибилизатором в отсутствие освещения. Расчет токсичности фотосенсибилизатора в отсутствие освещения («темновая» токсичность).
4. Облучение образцов, регистрация интенсивности биолюминесценции. Построение дозовых кривых фотодинамического подавления биолюминесценции, определение параметров D50 и фоточувствительности бактерий к фотодинамической инаktivации.
6. Исследование влияния концентрации солей в буферной среде на фоточувствительность бактерий к сенсibilизации.
7. Выводы по проделанной работе.

### **Предполагаемые результаты и навыки:**

1. Освоение методов измерения интенсивности биолюминесценции биосенсора;
2. Приобретение навыков облучения образцов бактериальных суспензий без и в присутствии фотосенсибилизаторов;
3. Приобретение навыков построения дозовых кривых и определения параметров фотоинактивации.

### **Оценка итогов проведенного практикума**

Основной формой отчетности студентов является письменный отчет по результатам исследования, который должен включать:

1. Теоретическое введение с описанием фотофизических и фотохимических основ явления фотодинамической инактивации, физико-химических свойств фотосенсибилизаторов и объекта исследований - генно-инженерного биолюминесцентного штамма грамотрицательных бактерий *Escherichia coli*.
2. Цели и задачи исследования.
3. Описание основных методов исследования.
4. Описание полученных результатов. Обработанные результаты представляются в виде графиков с дозовыми кривыми подавления биолюминесценции, значений параметров фотодинамической инактивации ( $D_{50}$ , фоточувствительность культуры).
5. Обсуждение полученных результатов.
5. Выводы по полученным результатам.

По представленному отчету преподаватель проводит со студентами устную беседу, в ходе которой студенты отвечают на вопросы по теоретическим основам выполняемой задачи, ходу выполнения работы, результатам и сделанным выводам. Отчет защищается студентом перед преподавателем на зачете.

### **Организация задачи практикума**

Задача выполняется группой студентов, состоящей из 2-3 человек. Группа работает под руководством преподавателя и ассистента.

Местом проведения является лаборатория фотобиологии микроорганизмов кафедры биофизики биологического факультета МГУ.

## Литература

1. Страховская М. Г., Антоненко Ю. Н., Пашковская А. А., Котова Е. А., Киреев В., Жуховицкий В. Г., Кузнецова Н. А., Южакова О. А., Негримовский В. М., Рубин А. Б. Электростатическое связывание замещенных металлофталоцианинов с клетками энтеробактерий: роль в фотодинамической инактивации. Биохимия. 2009. 74 (12): 1603-1614.
2. Hamblin M.R., Hasan T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? Photochem. Photobiol. Sci. 2004. 3(5): 436-50.
3. Jori G., Fabris C., Soncin M., Ferro S., Coppelotti O., Dei D., Fantetti L., Chiti G., Roncucci G. Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: basic principles and perspective applications. Lasers Surg. Med. 2006; 38(5): 468-81.