

НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

УДК 577.152

**ИЗУЧЕНИЕ КИНЕТИКИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ КОЛИСТИНА
С ЖИВЫМИ КЛЕТКАМИ *ESCHERICHIA COLI*
БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫМ МЕТОДОМ**

Галина Юрьевна Ломакина^{1,2}, Наталья Николаевна Угарова¹

¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, кафедра химической энзимологии

² Московский государственный технический университет им. Э.Н. Баумана

Автор, ответственный за переписку: Наталья Николаевна Угарова, nugarova@gmail.com

Аннотация. Получены кинетические зависимости концентрации аденозин-5'-трифосфата (АТР) внутри ($АТР_{in}$) и вне ($АТР_{ex}$) клеток *E. coli* от концентрации колистина и длительности инкубации в питательной LB-среде и в физиологическом растворе с помощью оптимизированного нами биолюминесцентного метода. С ростом концентрации колистина и длительности инкубации клеток в питательной среде значение $АТР_{in}$ быстро снижалось вплоть до нуля. При этом значение $АТР_{ex}$ возрастало, достигая предела (20–30% от исходной величины $АТР_{in}$) и не изменялось даже после полной гибели клетки. Существенное понижение $АТР_{in}$ можно объяснить снижением активности ферментов дыхательной цепи и $АТР_{синтазы}$, функционирующих во внутренней мембране клетки, повреждение которой при инкубации с колистином приводит к уменьшению скорости и даже остановке синтеза АТР. Сравнение $АТР_{in}$ и $АТР_{ex}$ при инкубации клеток в питательной среде и в физиологическом растворе в присутствии колистина показало, что колистин оказывает более сильный бактерицидный эффект на растущие, метаболически активные клетки, в то время как нерастущие клетки, лишенные питания, оказываются более устойчивыми к действию антибиотика.

Ключевые слова: биолюминесценция, люцифераза светляков, колистин, клетки *Escherichia coli*, АТР, жизнеспособность

Финансирование: работа выполнена в рамках госрегистрационной темы МГУ имени М.В. Ломоносова АААА-А21-121011290089-4.

Для цитирования: Ломакина Г.Ю., Угарова Н.Н. Изучение кинетики взаимодействия колистина с живыми клетками *Escherichia coli* биолюминесцентным методом // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. Т. 63. № 1. С. 55–63.

ORIGINAL ARTICLE

**KINETICS OF INTERACTION OF COLISTIN WITH LIVE CELLS
ESCHERICHIA COLI STUDIED BY BIOLUMINESCENT METHOD**

Galina Yu. Lomakina^{1,2}, Natalya N. Ugarova¹

¹ Department of Chemical Enzymology, Faculty of Chemistry, Lomonosov Moscow State University

² Bauman Moscow State Technical University

Corresponding author: Natalya N. Ugarova, nugarova@gmail.com

Abstract. The kinetics dependences of the ATP concentration inside (ATP_{in}) and outside (ATP_{ex}) of *E. coli* cells on the colistin concentration and duration of incubation in the LB medium and in saline were obtained using our optimized bioluminescent method. With increasing colistin concentration and duration of cell incubation in the nutrient medium, ATP_{in} rapidly decreased to zero. At the same time, ATP_{ex} increased, reached the limit (20–30% of the initial value of ATP_{in}) and did not change even after complete cell death. The loss of a significant part of ATP_{in} seems to be due to a decrease in the activity of respiratory chain enzymes and ATP synthase functioning in the inner cell membrane, damage of which during incubation with colistin leads to a decrease in the rate and even a stop in ATP synthesis. Comparison of ATP_{in} and ATP_{ex} during incubation of cells in the nutrient medium and in saline in the presence of colistin showed that colistin has a stronger bactericidal effect on growing, metabolically active cells, while non-growing cells deprived of nutrition are more resistant to the action of the antibiotic.

Keywords: bioluminescence, firefly luciferase, colistin, cells *Escherichia coli*, ATP, viability

Financial Support: the work was carried out within the framework of the state registration topic of Lomonosov Moscow State University AAAA21-121011290089-4.

For citation: Lomakina G.Yu., Ugarova N.N. Kinetics of Interaction of Colistin with Live Cells *Escherichia Coli* Studied by Bioluminescent Method // Vestn. Mosk. un-ta. Ser. 2. Chemistry. T. 63. N 1. P. 55–63.

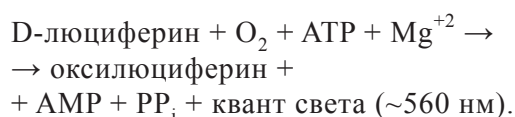
Использованные в статье сокращения: Luc – люцифераза светляков, ATP – аденозин-5'-трифосфат, AMP – аденозин-5'-монофосфат, PP_i – пиррофосфат, RLU – относительные световые единицы (relative light units), DMSO – диметилсульфоксид, ATP_{tot} – концентрация общего ATP в суспензии клеток, ATP_{in} – концентрация внутриклеточного ATP в суспензии клеток, ATP_{ex} – концентрация внеклеточного ATP в суспензии клеток, КОЕ – колониеобразующая единица.

Колистин – антибиотик группы полимиксинов, которые из-за их потенциальной нефротоксичности не находили широкого применения, хотя известны уже около 80 лет [1, 2]. Однако в последние годы в связи с быстрым распространением мультирезистентных грамотрицательных микроорганизмов и повышением смертности от этих инфекций клиницисты обратились к упомянутым антибиотикам как лекарственным агентам глубокого резерва. Одновременно усилился интерес исследователей к более детальному изучению механизма действия полимиксинов [3, 4]. Основной мишенью этих катионных полипептидов является внешняя мембрана микробных клеток [5, 6]. За счет положительного заряда аминокислотных остатков и гидрофобных липидных хвостов молекула антибиотика связывается с липополисахаридами внешней мембраны клетки, конкурентно вытесняя ионы Ca^{2+} и Mg^{2+} из отрицательно заряженной фосфатной группы липида А. Мембрана клетки ослабляется, увеличивается ее проницаемость в обе стороны, происходит вытекание в среду содержимого клетки, вследствие чего

она гибнет. Однако бактерицидная активность полимиксинов, вероятно, обусловлена не только разрушением внешней клеточной мембраны [7], но и пертурбациями в структуре внутренней мембраны, которая окружает цитоплазматическое пространство. В результате осуществляется фосфолипидный обмен между внутренней и внешней мембранами, теряется специфичность фосфолипидной композиции, что приводит к осмотической разбалансировке и смерти клетки [8, 9]. Нарушение клеточного дыхания рассматривается в качестве одной из возможных мишеней воздействия полимиксинов [10]. Вероятно, помимо воздействия на клеточную мембрану колестин влияет на многие внутриклеточные процессы, что нуждается в выяснении. Использование кинетических методов позволяет получить не только новые данные о механизме действия полимиксинов, но и найти условия их безопасного применения на практике.

Известны различные методы изучения кинетики действия антимикробных агентов на живые клетки микроорганизмов, однако не все они пригодны для быстрой регистрации изучаемого

эффекта. Методы классической микробиологии (определение КОЕ методом посевов) слишком длительны и трудоемки. Простые и быстрые методы спектрофотометрии (определение численности клеток по оптической плотности) применимы в узком диапазоне концентрации клеток и требуют дополнительных калибровок для правильного расчета [11, 12]. В настоящей работе для изучения кинетики взаимодействия живых клеток с колистином использован метод АТР-метрии. АТР – важнейший метаболит как прокариотических, так и эукариотических клеток. Концентрация АТР пропорциональна концентрации жизнеспособных клеток в образце [13]. Наиболее быстрым и высокочувствительным методом определения АТР служит метод биолуминесцентной АТР-метрии, основанный на использовании люциферин-люциферазной системы светляков [13]:



Биолуминесцентный метод успешно использовали для быстрого определения жизнеспособности клеток противотуберкулезной вакцины на основе живых клеток микобактерий [14, 15]. Этим методом можно контролировать концентрацию АТР как внутри, так и вне клеток. Это дает возможность наблюдать за процессом высвобождения АТР из клеток под действием мембранно-активного колистина и изменением концентрации внутриклеточного АТР, т.е. за изменением концентрации живых клеток в образце. Изучение кинетических зависимостей для АТР вне и внутри клеток *E. coli* в присутствии различных концентраций колистина, проведенное в данной работе, позволило получить новую информацию о механизме действия рассматриваемой группы антибиотиков на грамтрицательные патогены. Сделан вывод, что система синтеза АТР в микробной клетке является важной мишенью действия данного антибиотика.

Материалы и методы

Приготовление суспензии клеток для экспериментов. Штамм *E. coli* BL-21 (DE3) кодон плюс («Novagen», США) использован для получения ночной культуры, которую растили в LB-среде (37 °С, 250 об/мин) до $A_{590} = 3,0 \pm 0,2$ в течение 17–18 ч, используя шейкер-инкубатор «ES-20» («Biosan», Латвия). Полученную суспензию клеток разбавляли в 200–1000 раз свежей LB-средой или физиологическим рас-

твором (0,9%-й NaCl) и немедленно использовали в экспериментах с колистином. Запасный раствор колистина («Hebei Shengxue Dacheng Pharmaceutical», Китай) в физиологическом растворе (или физиологический раствор в качестве контроля) добавляли к суспензии клеток в отношении 1:4 до конечной концентрации 0,001–1,000 мг/мл. Образцы инкубировали, используя орбитальный шейкер, при 37 °С и 250 об/мин в течение 1 ч. В процессе инкубации отбирали пробы для измерения концентрации АТР внутри и вне клеток каждые 10–15 мин.

Для определения КОЕ клетки высевали на чашки с агаром (5 г/л дрожжевой экстракт, 10 г/л триптон, 10 г/л NaCl и 11 г/л агар) и инкубировали в течение 20 ч (37 °С, 250 об/мин).

Измерение концентрации АТР биолуминесцентным методом. Использованы АТР-реагент и АТР-контроль, состав которых был разработан нами ранее [13]. Лиофилизированный АТР-реагент [16], содержащий термостабильную люциферазу светляков *Luciola mingrelia* [17] и все необходимые компоненты для люциферазной реакции (D-люциферин («БХМ СТ», Россия), сульфат магния, сахарозу, («Хеликон», Россия), пирогосфат натрия, BSA («Sigma», США), компоненты буфера) реконструировали в 4 мл деионизированной воды за 1 ч перед началом измерений. Лиофилизированный АТР-контроль содержал известную порцию чистого АТР («Sigma», США).

При измерении общей концентрации АТР (АТР_{tot}) 20 мкл суспензии клеток вносили в 180 мкл диметилсульфоксида (DMSO), перемешивали и инкубировали в течение 1 мин. Затем 20 мкл полученного экстракта вносили в полистирольную микрокювету (cat. N507050, Grenier), добавляли 100 мкл раствора АТР-реагента, быстро перемешивали и измеряли интенсивность биолуминесценции (I_{extract}) на люцинометре «ЛЮМ-1» (Россия). Параллельно лиофилизированный АТР-контроль реконструировали в 0,2 мл 90% DMSO и измеряли интенсивность биолуминесценции (I_{control}) так же, как выше описано для экстракта клеток. Общую концентрацию АТР (нМ) в образце АТР_{tot} вычисляли по формуле (1):

$$[\text{АТР}_{\text{tot}}] = 10 \cdot [\text{АТР}_{\text{control}}] \cdot (I_{\text{extract}}/I_{\text{control}}), \quad (1)$$

где коэффициент 10 учитывает разбавление суспензии клеток при получении экстракта в DMSO.

При измерении концентрации внеклеточного АТР (АТР_{ex}) 20 мкл суспензии клеток в LB-среде или в физиологическом растворе

вводили в полистирольную кювету, добавляли 100 мкл раствора АТР-реагента, быстро перемешивали и измеряли интенсивность биолюминесценции на люминиметре «ЛЮМ-1». Одновременно лиофилизированный АТР-контроль реконструировали в 0,2 мл LB-среды или физиологического раствора и измеряли интенсивность биолюминесценции (I_{control}), как описано выше. Концентрацию АТР_{ex} вычисляли по формуле (1), используя коэффициент, равный 1.

Концентрацию внутриклеточного АТР (АТР_{in}) рассчитывали по формуле (2):

$$\text{АТР}_{\text{in}} = \text{АТР}_{\text{tot}} - \text{АТР}_{\text{ex}} \quad (2)$$

Все работы с клетками и измерения биолюминесценции проводили в ламинарном боксе.

Обработка результатов измерений. Результаты трех независимых экспериментов оценивали по Стьюдент-тесту. Величина $p < 0,05$ рассматривалась как статистически значимая. Статистическую обработку выполняли с помощью программ MS Excel Microsoft Office 2019 и Origin 8.

Результаты и обсуждение

Корреляция между биолюминесцентным методом и методом посевов. Возможность использования метода биолюминесцентной АТР-метрии для изучения кинетики взаимодействия колистина с живыми клетками *E. coli* была показана в следующем эксперименте. Суспензию

клеток инкубировали при содержании колистина в разной концентрации. Через 1 ч после начала инкубирования одновременно отбирали пробы для измерения концентрации АТР_{tot} биолюминесцентным методом и для определения числа живых клеток методом посевов разведений на чашки Петри с агаризованной питательной средой. Через 24 ч проводили подсчет колоний. Зависимости, полученные двумя методами, хорошо коррелировали между собой (рис. 1). Уменьшение значения АТР_{tot} свидетельствует о снижении содержания жизнеспособных клеток в реакционной среде. Преимущество биолюминесцентного метода заключается в том, что эти измерения проводятся в течение нескольких минут, тогда как результаты методом посевов получают через сутки.

Биолюминесцентный метод позволил быстро сравнивать различия в кинетике роста клеток при инкубации в питательной LB-среде и физиологическом растворе. Для суспензий с разной начальной концентрацией клеток (рис. 2) показано, что за 1 ч инкубации в физиологическом растворе практически не происходит изменения АТР_{tot} (рост клеток отсутствует, метаболический статус снижен), а в питательной среде наблюдается рост АТР_{tot} в 2,3–2,5 раза.

Кинетика взаимодействия колистина с клетками *E. coli* при инкубации в физиологическом растворе. Получены зависимости АТР_{tot} , АТР_{ex} и АТР_{in} от времени инкубации в физиологическом растворе при различных концентрациях

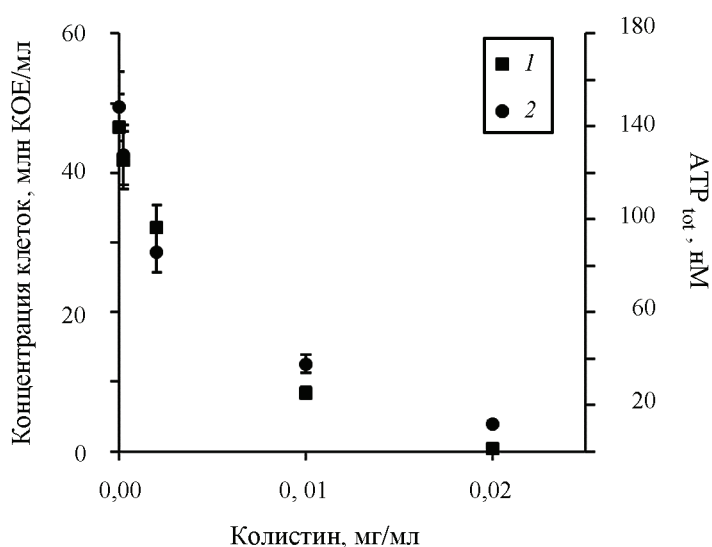


Рис. 1. Концентрация клеток (1) и значение АТР_{tot} (2) после инкубации суспензии клеток *E. coli* в присутствии различных концентраций колистина. Условия инкубации: 1 ч, LB-среда, 37 °С. Стандартное отклонение $\pm 10\%$ ($n = 3$)

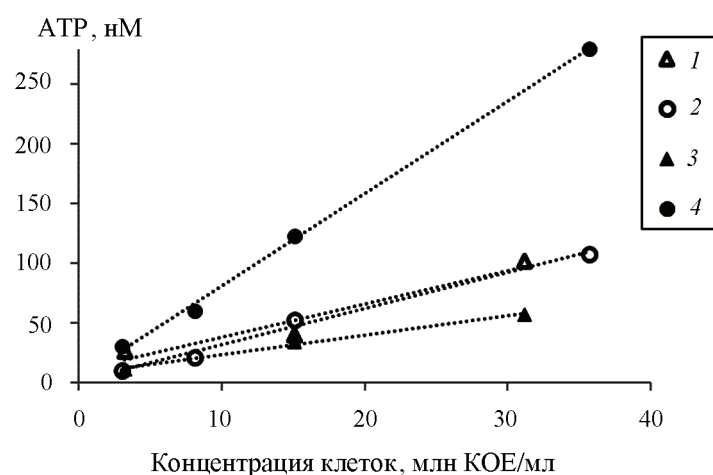


Рис. 2. Зависимости $АТР_{tot}$ от концентрации клеток в начальный момент времени в физиологическом растворе (1) и в LB-среде (2) и через 60 мин инкубации при 37 °С в физиологическом растворе (3) и в LB-среде (4). Стандартное отклонение $\pm 10\%$ ($n = 3$)

колистина. Типичные данные для суспензии, содержащей 15 млн кл/мл, представлены в табл. 1.

Согласно данным табл. 1, при концентрации колистина 0,01 мг/мл величины $АТР_{in}$ и $АТР_{ex}$ изменяются незначительно, причем концентрация $АТР_{ex}$ не превышает 2% от $АТР_{in}$. С ростом концентрации колистина несколько увеличивается значение $АТР_{ex}$, но снижение $АТР_{in}$ происходит гораздо быстрее, поэтому содержание $АТР_{ex}$ по отношению к $АТР_{in}$ достигает 10% и более. На основании кинетических кривых были рассчитаны значения начальной скорости изменения $АТР_{ex}$ и $АТР_{in}$ в зависимости от концентрации колистина (рис. 3).

Скорость роста $АТР_{ex}$ характеризует процесс увеличения проницаемости клеточной мембраны для АТР. Скорость убыли $АТР_{in}$ характеризует снижение метаболической активности, а следовательно, численности жизнеспособных клеток в реакционной смеси. Наблюдаемое сильное (пятикратное) различие этих показателей свидетельствует о том, что уменьшение концентрации жизнеспособных клеток происходит не только и не столько из-за вытекания АТР из клеток, но также из-за нарушения баланса между процессами синтеза/гидролиза АТР внутри клетки.

Кинетика взаимодействия колистина с клетками *E. coli* при инкубации в питательной среде. Получены зависимости $АТР_{tot}$, $АТР_{in}$ и $АТР_{ex}$ от длительности инкубирования суспензии клеток в питательной LB-среде при содержании колистина в разной

концентрации. В табл. 2 в качестве типичного примера приведены результаты для суспензии, содержащей 15 млн кл/мл.

Данные табл. 2 показывают, что в этих условиях протекают два конкурирующих процесса: рост клеток и их гибель под действием колистина. В отсутствие колистина клетки активно растут и через 1 ч инкубации $АТР_{in}$ увеличивается в ~ 2 раза. При 0,02 мг/мл колистина рост продолжается первые 15 мин, но затем $АТР_{in}$ начинает снижаться, а при более высоких концентрациях колистина ($\geq 0,1$ мг/мл) роста не наблюдается и $АТР_{in}$ быстро снижается до нуля. Полученные данные (табл. 1, 2) показывают, что колистин оказывает более сильное бактерицидное действие на метаболически активные, растущие клетки по сравнению с клетками в физиологическом растворе, где питание клеток отсутствует. Так, при одной и той же концентрации колистина (0,1 мг/мл) через 1 ч в физиологическом растворе жизнеспособность сохраняют около 40% клеток, в то время как в питательной среде уже через 45 мин жизнеспособные клетки не регистрируются.

Уровень $АТР_{ex}$ служит не только индикатором изменения проницаемости клеточной мембраны под действием разных эффекторов, вызывающих вытекание внутриклеточного АТР во внеклеточное пространство, но и информативным показателем метаболического состояния живых клеток. В литературе неоднократно отмечалось, что рост и деление клеток сопровождаются выбросом небольшого количества АТР из клетки в среду [18–20]. В нашем случае

Т а б л и ц а 1

Зависимости ATP_{tot} , ATP_{ex} и ATP_{in} от времени инкубации в физиологическом растворе при различных концентрациях колистина. Условия: 15 млн кл/мл, 37 °С, с перемешиванием. Стандартное отклонение $\pm 10\%$

Концентрация колистина, мг/мл	Время инкубации, мин	Концентрация АТФ, нМ			АТФ/АТФ ₀		
		АТФ _{tot}	АТФ _{ex}	АТФ _{in}	АТФ _{tot}	АТФ _{ex}	АТФ _{in}
0	0	38,7	0,2	38,5	1,0	1,0	1,0
	23	34,6	0,2	34,4	0,9	1,2	0,9
	84	28,8	0,3	28,5	0,7	1,8	0,7
0,01	0	38,7	0,2	38,5	1,0	1,0	1,0
	31	32,9	0,4	32,5	0,9	2,0	0,8
	72	26,7	0,4	26,3	0,7	2,4	0,7
0,02	0	38,7	0,2	38,5	1,0	1,0	1,0
	4	36,8	0,3	36,5	1,0	1,8	0,9
	15	35,2	0,4	34,8	0,9	2,2	0,9
	45	29,2	0,5	28,7	0,8	2,6	0,8
	70	24,9	0,6	24,3	0,6	3,3	0,6
0,1	0	38,7	0,2	38,5	1,0	1,0	1,0
	3	33,7	0,7	33,0	0,9	4,1	0,9
	13	30,2	1,0	29,2	0,8	5,7	0,8
	28	21,4	1,3	20,1	0,6	7,3	0,5
	67	15,8	1,4	14,4	0,4	7,9	0,4
0,2	0	38,7	0,2	38,5	1,0	1,0	1,0
	2	33,2	1,1	32,1	0,9	6,1	0,8
	12	22,2	1,2	21,0	0,6	6,8	0,5
	25	18,1	1,4	16,7	0,5	8,1	0,4
	40	13,2	1,6	11,6	0,3	8,9	0,3
	49	11,3	1,5	9,8	0,3	8,5	0,2

в начальный момент времени значение ATP_{ex} составляло около 7% от значения ATP_{in} . В отсутствие колистина в процессе роста ATP_{in} наблюдался также рост ATP_{ex} . В течение 1 ч значение ATP_{ex} увеличилось в 7 раз и составило 21% от текущего значения ATP_{in} (табл. 2). При концентрации колистина 0,02 мг/мл в первые 15–30 мин инкубации наблюдался рост ATP_{ex} в 3–5 раз, далее уровень ATP_{ex} не изменялся даже после полного расходования ATP_{in} . При более высокой концентрации колистина (0,1–1,0 мг/мл) роста клеток не наблюдалось, причем чем выше была концентрация колистина, тем раньше прекращался рост ATP_{ex} . Можно было бы ожидать,

что за счет увеличения под действием антибиотика проницаемости клеточной мембраны при резком снижении ATP_{in} значительно возрастет ATP_{ex} . Но как показывают данные табл. 2 и кинетические кривые (рис. 4), этого не происходит. При инкубации с колистином ATP_{ex} возрастает, достигая предельной величины, которая не превышает ~30% от исходной величины ATP_{in} .

АТФ в клетках *E. coli* в основном продуцируется в цитоплазме с участием мембранных ферментных систем дыхательной цепи и АТФ синтазы, затем транспортируется в периплазматическое пространство, откуда может либо

Таблица 2

Зависимости ATP_{tot} , ATP_{ex} и ATP_{in} от времени инкубации в питательной LB среде при различных концентрациях колистина. Условия: 15 млн кл/мл, 37 °С, с перемешиванием. Стандартное отклонение $\pm 10\%$

Концентрация колистина, мг/мл	Время инкубации, мин	Концентрация ATP, нМ			ATP/ATP ₀		
		ATP _{tot}	ATP _{ex}	ATP _{in}	ATP _{tot}	ATP _{ex}	ATP _{in}
0	0	52,4	3,4	49,0	1,00	1,00	1,00
	15	96,1	8,0	88,1	1,83	2,35	1,80
	30	106,0	13,6	92,4	2,02	4,00	1,89
	45	105,0	16,0	89,0	2,00	4,71	1,82
	60	124,0	21,6	102,4	2,37	6,35	2,09
0,02	0	52,4	3,4	49,0	1,00	1,00	1,00
	15	86,8	8,4	78,4	1,66	2,47	1,60
	30	79,6	12,5	67,1	1,52	3,68	1,37
	45	77,2	14,3	62,9	1,47	4,21	1,28
	60	57,9	20,3	37,6	1,10	5,97	0,78
0,1	0	52,4	3,4	49,0	1,00	1,00	1,00
	15	59,6	9,8	49,8	1,14	2,88	1,02
	30	20,7	16,3	4,4	0,39	4,79	0,09
	45	15,7	16,8	0	0,30	4,94	0
	60	15,3	16,3	0	0,29	4,79	0
0,2	0	52,4	3,4	49,0	1,00	1,00	1,00
	15	34,7	11,3	23,4	0,66	3,32	0,48
	30	13,3	13,5	0	0,25	3,97	0
	45	13,2	15,0	0	0,25	4,41	0
	60	11,3	12,7	0	0,22	3,73	0
1,0	0	52,4	3,4	49,0	1,00	1,00	1,00
	15	10,1	10,4	0	0,19	3,06	0
	30	9,74	11,5	0	0,19	3,38	0
	45	11,5	11,5	0	0,22	3,38	0
	60	10,5	12,9	0	0,20	3,79	0

секретироваться из клетки, либо гидролизироваться под действием ферментов до ADP, AMP и аденозина [19]. Разрушение внешней мембраны клетки приводит к вытеканию ATP из периплазматического пространства в среду и росту ATP_{ex}, однако наши данные показывают, что при инкубации суспензии клеток с колистином большая часть ATP из начального пула ATP_{in} не детектируется ни вне, ни внутри клеток. Нарушение проницаемости внешней мем-

браны клеток при инкубировании с колистином должно было бы приводить к высвобождению ферментов, утилизирующих ATP, во внеклеточное пространство и вызывать деградацию ATP в реакционной среде. Однако наличие остаточной концентрации ATP_{ex} в растворе после полного расходования ATP_{in} указывает на то, что в данных условиях среда не содержит ферментов, утилизирующих ATP. В литературе есть указания на протекание гидролиза ATP_{ex} в

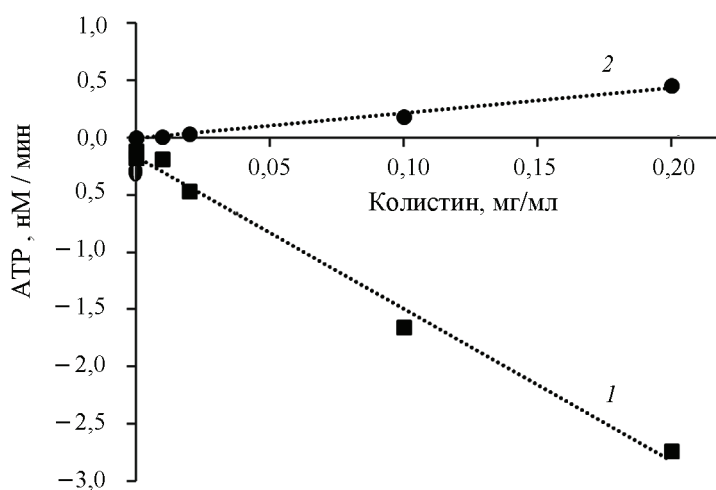


Рис. 3. Зависимость начальной скорости изменения ATP_{in} (1) и ATP_{ex} (2) при инкубировании суспензии клеток *E. coli* в физиологическом растворе при различных концентрациях колистина. Условия: 15 млн кл/мл, 37 °С, перемешивание. Стандартное отклонение $\pm 10\%$ ($n = 3$)

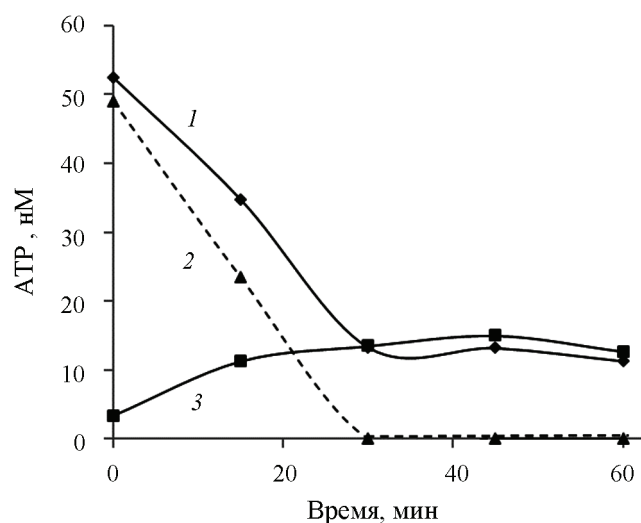


Рис. 4. Зависимости ATP_{tot} (1), ATP_{in} (2) и ATP_{ex} (3) от времени инкубации в питательной LB-среде в присутствии 0,2 мг/мл колистина. Условия: 15 млн кл/мл, 37 °С, перемешивание. Стандартное отклонение $\pm 10\%$

среде в присутствии компонентов клетки [18]. Для проверки возможной активности АТРа_з во внеклеточном пространстве мы провели дополнительный эксперимент: в процессе инкубации клеток в присутствии 1 мг/мл колистина через 20 мин после начала инкубации был добавлен АТР, его концентрация в клеточной суспензии удвоилась и не изменялась в течение последующих 40 мин инкубации. Отсутствие гидролиза внеклеточного АТР свидетельствует о том, что АТРа_зы клеток *E. coli* не функционируют во внеклеточном пространстве. Этим объясняется и тот факт, что накопившаяся ATP_{ex} сохраняет-

ся в неизменной концентрации даже после полного лизиса клеток под действием колистина. Из всего сказанного следует, что АТР утилизируется именно внутри клетки, причем скорость его расходования не компенсируется скоростью синтеза, и в результате концентрация ATP_{in} резко снижается. Это можно объяснить сильным снижением активности ферментов дыхательной цепи и АТР синтазы, функционирующих во внутренней мембране клетки, повреждение которой при инкубации с колистином приводит к резкому снижению скорости и даже остановке синтеза АТР.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hancock R.E.W., Chapple D.S. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 1999. Vol. 43. P. 1317.
2. Velkov T., Thompson P.E., Nation R.L., Li J. // *J. Med. Chem.* 2010. Vol. 53. P. 1898.
3. Moubareck C.A. // *Membranes.* 2020. Vol. 10. P. 181.
4. Olaitan A.O., Morand S., Rolain J.M. // *Front. Microbiol.* 2014. Vol. 5. P. 643.
5. Mortensen N.P., Fowlkes J., Sullivan C.J. // *Langmuir.* 2009. Vol. 25. P. 3728.
6. Sahalan A.Z., Dixon R.A. // *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2008. Vol. 31. P. 224.
7. Trimble M.J., Mlynářčík P., Kolář M., Hancock R.E. // *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2016. Vol. 6. P. a025288.
8. Lu S., Walters G., Parg R., Dutcher J.R. // *Soft Matter.* 2014. Vol. 10. P. 1806.
9. Clausell A., Garcia-Subirats M., Pujol M., Busquets M.A., Rabanal F., Cajal Y. // *J. Phys. Chem. B.* 2007. Vol. 111. P. 551.
10. Deris Z.Z., Akter J., Sivanesan S., Roberts K.D., Thompson P.E., Nation R.L., Li J., Velkov T. // *J. Antibiot.* 2014. Vol. 67. P. 147.
11. Levashov P.A., Sedov S.A., Shipovskov S., Belogurova N.G., Levashov A.V. // *Anal. Chem.* 2010. Vol. 82. P. 2161.
12. Матолыгина Д.А., Осипова Е.Э., Смирнов С.А., Белогурова Н.Г., Еремеев, Н.Л., Тишков В.И., Левашов А.В., Левашов П.А. // *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия.* 2015. Т. 56. № 6. С. 365.
13. Lomakina G.Yu., Modestova Yu.A., Ugarova N.N. // *Biochem. (Moscow).* 2015. Vol. 80. P. 701.
14. Ugarova N.N., Lomakina G.Yu., Modestova Yu.A., Chernikov S.V., Vinokurova N.V., Otrashvskaya E.V., Gorbachev V.Y. // *J. Microbiol. Meth.* 2016. Vol. 130. N 1. P. 48.
15. Угарова Н.Н., Ломакина Г.Ю., Перевышина Т.А., Отрашевская Е.В., Черников С.В. // *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия.* 2019. Т. 60. № 4. С. 254.
16. Ugarova N.N., Koksharov M.I., Lomakina G.Y. // 2009. RF Patent 2420594.
17. Koksharov M.I., Ugarova N.N. // *Prot. Engin. Des. Selec.* 2011. Vol. 24. P. 835.
18. Mempin R, Tran H., Chen C., Gong H., Ho K. K., Lu S. // *BMC Microbiology.* 2013. Vol. 13. P. 301.
19. Spari D., Beldi G. // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. Vol. 21. P. 5590.
20. Ihssen J., Jovanovic N., Sirec T., Spitz U. // *PLoS ONE* 2021. Vol. 16. P. e0244200.

Информация об авторах

Ломакина Галина Юрьевна – ст. науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ, канд. хим. наук, lomakinagalina@yahoo.com;

Угарова Наталья Николаевна – глав. науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ, докт. хим. наук, nugarova@gmail.com.

Вклад авторов

Все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила в редакцию 16.09.2021;
одобрена после рецензирования 12.10.2021;
принята к публикации 14.10.2021.