

ПЕРСПЕКТИВНЫЙ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОР ДЛЯ АНТИМИКРОБНОЙ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ

М.Г. Страховская¹, Н.С. Беленикина¹, В.В. Никитина¹,
С.Ю. Коваленко², И.Б. Коваленко², А.В. Аверьянов², А.Б. Рубин¹

¹Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова,
биологический факультет, Москва

²Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи
и медицинских технологий ФМБА России, Москва

Показана высокая антимикробная активность и широкий спектр действия фотосенсибилизатора из класса поликатионных металлофталоцианинов. Установлено, что эффективная фотодинамическая инактивация бактерий в присутствии фотосенсибилизатора поликатионной природы определяется его электростатическим связыванием с отрицательно заряженными структурами клеточных стенок бактерий. Полученные результаты обсуждаются с точки зрения перспектив применения антимикробной фотодинамической терапии в медицинской практике.

Ключевые слова: фотосенсибилизатор, активные формы кислорода, антимикробная фотодинамическая терапия

PROMISING PHOTOSENSITIZER FOR ANTIMICROBIAL PHOTODYNAMIC THERAPY

Strakhovskaya M.G., Belenikina N.S., Nikitina V.V., Kovalenko S.Yu., Kovalenko I.B.,
Averyanov A.V., Rubin A.B.

A photosensitizer from polycationic metallophthalocyanines class is shown to have a high antimicrobial activity and a wide antimicrobial spectrum. It is established that the effective photodynamic inactivation of bacteria in the presence of photosensitizer of polycationic nature is determined by its electrostatic binding to negatively charged structures of bacterial cell walls. The usage of antimicrobial photodynamic therapy in medical practice is discussed from the point of view of the obtained results.

Key words: photosensitizer, reactive oxygen species, antimicrobial photodynamic therapy

Фотодинамическая инактивация микроорганизмов, в основе которой лежат цитотоксические свойства активных форм кислорода (АФК), генерируемых красителями-фотосенсибилизаторами в фотовозбужденном 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 альтерна-

тивных способов борьбы с возбудителями инфекционных заболеваний. 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 [1]. Множе-

ственный 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 [2]. Общепринято, 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 двухслойная асимметричная 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 [3]. Суммарный отрицательный заряд ЛПС связан с высоким содержанием отрицательно заряженных групп в центральной части этих макромолекул – остатками фосфорной кислоты в D-глюкозамине липида А и/или гептозах кора, карбоксильными группами остатков 3-дезоксид-Д-манно-октулозоновой кислоты (КДО) и кислых сахаров кора (галактозы, глюкуроновой кислоты). У грамотрицательных бактерий существуют пути модификации ЛПС, приводящие к уменьшению плотности отрицательных зарядов на поверхности клеток [4]: присоединение положительно заряженных групп (фосфоэтаноламина, аминокарабинозы, глюкозамина) к липиду А и гептозам кора, а также дефосфорилирование этих компонентов ЛПС.

Повышение чувствительности грамотрицательных бактерий к фотосенсибилизации имеет место при их дополнительной обработке заряженными поликатионными соединениями [5]. Под воздействием поликатионов происходит высвобождение ЛПС, дезинтеграция наружной мембраны и увеличение ее проницаемости для красителей. Поликатион может быть также использован как наноноситель антибактериальных препаратов, повышающий избирательность их действия за счет электростатического взаимодействия с клеточной стенкой бактерий. Подобные подходы лежат в основе сенсибилизации бактерий с помощью полимиксина, а также использования конъюгатов анионных красителей с полилизинном для повышения

их фотобактерицидной активности. В то же время и сами молекулы красителей одновременно с ядром – генератором активных форм кислорода, могут нести положительно заряженные заместители, повышающие эффективность взаимодействия фотосенсибилизатора с бактериальной клеткой-мишенью. К таким фотосенсибилизаторам относятся поликатионные фталоцианины, с высокой эффективностью генерирующие синглетный кислород и показавшие высокую эффективность на бактериальной биолюминесцентной тест-системе [6, 7]. В настоящей работе мы приводим данные по антимикробной активности одного из наиболее перспективных соединений – октакатионного фталоцианина цинка.

Материалы и методы исследования

Объектами исследования служили: эталонные штаммы грамположительных бактерий *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 и *Streptococcus pyogenes* 151 БГСА, а также грамотрицательных бактерий *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Campylobacter jejuni* NCTC 11635, *Helicobacter pylori* NCTC 11639, *Salmonella enteritidis* 1742; клинические изоляты бактерий, среди которых имелись возбудители инфекций кожи и слизистых, и раневых инфекций (*S. aureus*, *S. pyogenes*, *E. coli*, *P. aeruginosa*); виды, вызывающие поражения слизистых желудочно-кишечного тракта (*C. jejuni*, *H. pylori*, *S. enteritidis*, *E. coli*, *Serratia marcescens*, *Proteus mirabilis*). Для культивирования бактерий применяли соответствующие среды: Columbia Agar с добавлением 5% (об/об) или 10% (об/об) бараньей крови, Columbia Agar с добавлением 7% (об/об) лизированной лошадиной крови и Tryptic Soya Agar ("bioMerieux", Франция). Бактерии выращивали в течение суток в термостате при 37°C. Микроаэрофильные штаммы *C. jejuni* и *H. pylori* выращивали в анаэробных условиях в среде с 5% кислорода в течение 4-х суток при 37°C. Материал агаровых культур суспендировали в растворе для инфузий, содержащем 0,9% хлорида натрия, до показателя мутности 1,0 McF с использованием денситометра "Densimat" ("bioMerieux", Франция).

Облучение проводили с использованием источника холодного белого света ЭКОМП (50 мВт/см²) или светодиодного источника красного света с максимумом испускания 684 нм и интенсивностью излучения на уровне образца 20 мВт/см².

Для определения количества красителя октакис(холинил)-фталоцианина цинка, связавшегося в процессе инкубации с бактериальными клетками, раствор красителя в 0,9% NaCl или суспензию бактерий (10^8 КОЕ/мл) в 0,9% NaCl с той же концентрацией красителя инкубировали при комнатной температуре и пропускали через фильтры с диаметром пор 0,2 мкм ("Sarstedt", Австрия). Количество связавшегося красителя рассчитывали по разнице поглощения фильтратов, учитывая, что для используемого красителя молярный коэффициент поглощения в максимуме $\epsilon_{683} = 190000 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$.

Поверхностный дзета-потенциал бактериальных клеток измеряли на приборе Zetasizer Nano Z (Malvern Instruments Ltd).

Каждый эксперимент проводили не менее трех-пяти раз. Данные представлены в виде средних значений исследуемых величин \pm стандартное отклонение.

В работе использовали реактивы фирмы Sigma (Сент-Луис, США), а также фотосенсибилизатор октакис(холинил)-фталоцианин цинка, синтезированный в ФГУП ГНЦ «НИО-ПИК».

Результаты и обсуждение

При исследовании спектра антимикробной активности октакис(холинил)-фталоцианина цинка были определены минимальные подавляющие рост микроорганизмов концентрации препарата (МПК₉₀) эталонных и клинических штаммов грамположительных и грамотрицательных бактерий. МПК₉₀ для клинических видов грамположительных бактерий составляла 0,25-0,30 мкг/мл, а для эталонных штаммов – менее 0,25 мкг/мл при дозе облучения красным светом 5 Дж/см² (табл.).

Октакис(холинил)-фталоцианин цинк проявлял высокую фотодинамическую активность также в отношении грамотрицательных бактерий, хотя и меньшую по сравнению с грамположительными штаммами. МПК₉₀ в зависимости от вида грамотрицательных бактерий колебалась в достаточно широких пределах – 0,4-2,5 мкг/мл (табл.). Наиболее низкая активность фотосенсибилизатора выявлена в отношении *Klebsiella spp.* и *Proteus mirabilis* (МПК₉₀ 2,1-2,5 мкг/мл).

Таким образом, антимикробная фотодинамическая активность октакис-(холинил)фталоцианина цинка проявляется в отношении различных видов бактерий, в том числе клини-

ческих штаммов грамотрицательных бактерий и MRSA штамма золотистого стафилококка. Полученные данные позволяют считать, что данный фотосенсибилизатор имеет широкий спектр антимикробной активности и перспективен для АФДТ различных бактериальных заражений. Однако при этом обнаружена значительная гетерогенность бактериальных штаммов в отношении чувствительности к фотодинамической инактивации, которая наблюдалась как между штаммами одного вида (эталонный штамм ATCC 25922 и клинический изолят *E. coli*), так и между различными видами (табл., рис. 1).

Известно, что среди различных штаммов бактерий имеется значительная гетерогенность строения олигосахаридов липида А и

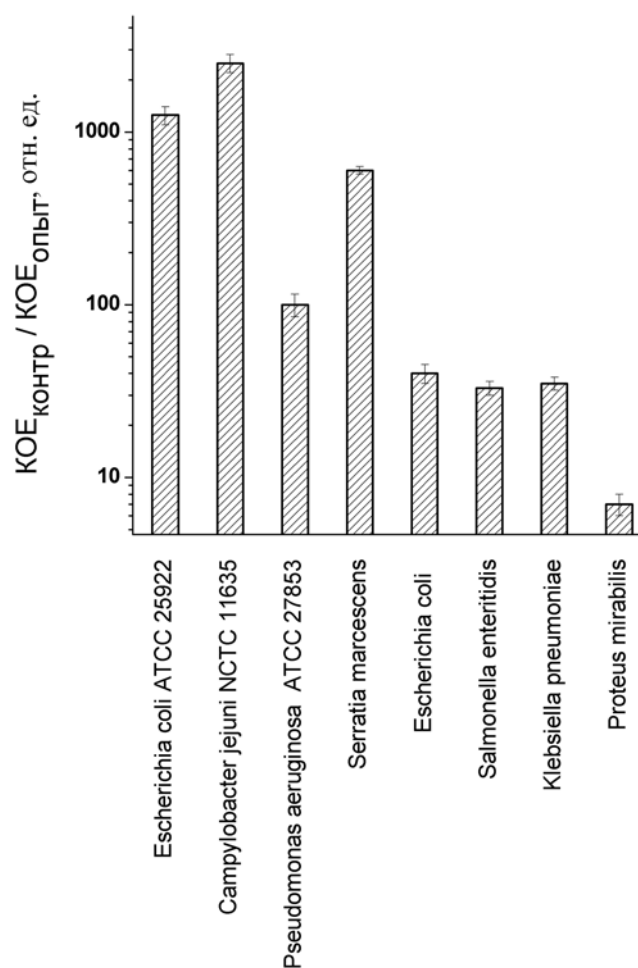


Рис. 1. Эффективность фотодинамической инактивации по тесту уменьшения колониеобразующей способности (КОЕ_{контр}/КОЕ_{опыт}) различных штаммов бактерий после 10 мин инкубации суспензий с исходной плотностью 10^8 КОЕ/мл в 0,9% NaCl с 1 мкМ октакис(холинил)-фталоцианина цинка и облучения белым светом в дозе 9 Дж/см².

**Активность *in vitro* октакис(холинил)-фталоцианина цинка
(минимальная подавляющая рост концентрация МПК₉₀, мкг/мл)
в отношении различных штаммов бактерий при облучении
дозой красного света 684 нм 5 Дж/см²**

Микроорганизмы	МПК ₉₀ , мкг/мл
<i>Staphylococcus aureus</i> (MSSA)	Менее 0,25
<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	0,25
<i>Streptococcus pyogenes</i>	0,3
<i>Enterococcus faecalis</i>	0,25
<i>Escherichia coli</i>	0,6
<i>Helicobacter pylori</i>	0,5
<i>Salmonella enteritidis</i>	1
<i>Proteus mirabilis</i>	2,5
<i>Serratia marcescens</i>	0,4
<i>Klebsiella spp.</i>	2,1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1,2
<i>Neisseria spp.</i>	1,5
<i>Haemophilus influenzae</i>	1
<i>Moraxella catarrhalis</i>	1,7
<i>Bacteroides fragilis</i>	1
<i>Prevotella melaninogenica</i>	1,1
<i>Clostridium septicum</i>	1,8

кора ЛПС [3, 4]. Бактерии *P. mirabilis* проявляют высокую устойчивость к полимиксину В и протегринам, что связывают с присутствием в ЛПС положительно заряженных молекул аминокислот. Сходная закономерность наблюдалась и в отношении устойчивости этих видов бактерий к фотодинамической инактивации (рис. 1). Среди 4-х клинических изолятов из группы энтеробактерий наиболее устойчивыми к фотодинамической инактивации оказались *P. mirabilis*. Эффективность фотоинакти-

вации *E. coli* и *S. enteritidis* была на порядок, а *S. marcescens* на 2 порядка выше. Спектрофотометрическое определение концентрации фотосенсибилизатора в фильтрах показало, что в диапазоне 0,2-1 мкМ клетки *P. mirabilis* связывали октакис(холинил)фталоцианин цинка в гораздо меньшей степени по сравнению с *E. coli* и *S. marcescens* (рис. 2).

Повышенное сродство октакатионного фталоцианинового фотосенсибилизатора к клеткам *S. marcescens* является, очевидно, следстви-

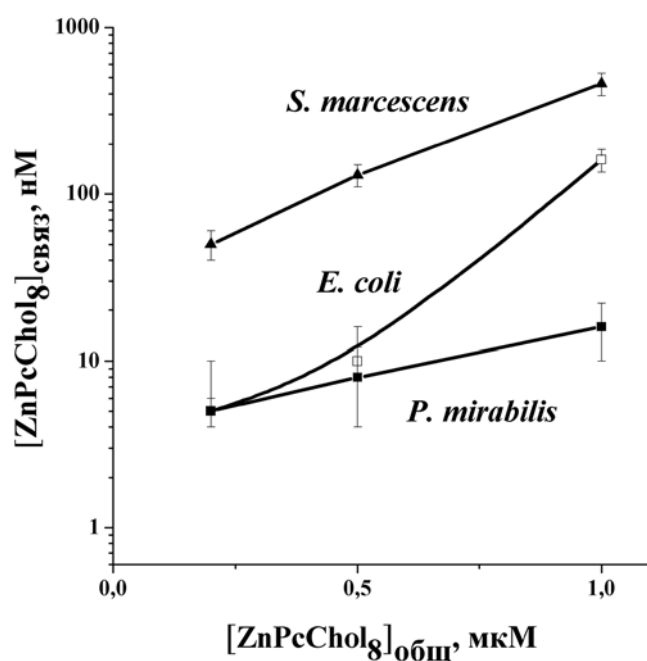


Рис. 2. Связывание октакис(холинил)-фталоцианина цинка клетками различных видов бактерий (10^8 КОЕ/мл в 0,9% NaCl). Количество связанного красителя $[ZnPcChol8]_{связ}$ рассчитано по разнице поглощения красителя ($\epsilon_{683} = 190000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) в фильтрах его бесклеточных растворов – $[ZnPcChol8]_{общ}$ и клеточных суспензий после 10 мин инкубации – $[ZnPcChol8]_{своб}$

ем отсутствия положительно заряженных заместителей в ЛПС этого вида. Напротив, показано, что липид А ЛПС *S. marcescens* содержит два глюкозаминных остатка, каждый из которых фосфорилирован, т.е. несет отрицательный заряд.

Таким образом, катионные фотосенсибилизаторы более эффективно взаимодействуют с бактериальными клетками, ЛПС которых несут большее количество отрицательно заряженных групп. Из рис. 3 видно, что при связывании октакатионного фталоцианина с клетками *E. coli* происходит нейтрализация отрицательного заряда клеток. Таким образом, механизм, обеспечивающим связывание катионных фотосенсибилизаторов микробными клетками, является электростатическое взаимодействие положительно заряженных заместителей в молекулах фотосенсибилизатора с отрицательно заряженными центрами связывания на клеточных стенках.

Заключение

Ключевыми параметрами, определяющими,

какие из клеточных компонентов или метаболических процессов будут повреждены или инактивированы в процессе АФДТ, а также общую эффективность поражения бактериальных клеток, являются сродство фотосенсибилизатора к клеткам-мишеням и кинетика его захвата с прокрашиванием клеточного объема. Это, в свою очередь, зависит от заряда молекул фотосенсибилизатора. Условием эффективной прямой фотодинамической инактивации является тесная ассоциация фотосенсибилизатора с биологической мишенью, что следует из малого (10-50 нм) диффузионного радиуса синглетного кислорода в биологической среде [1, 5]. Цитоплазматическая мембрана бактерий отделена от внешней среды клеточной стенкой толщиной от 10 до 80 нм в зависимости от видовой принадлежности. Отрицательный заряд клеточных стенок бактерий обуславливает электростатическое связывание с ними катионных соединений. Фотобактерицидная активность октакис(холинил)-фталоцианина цинка определяется наличием восьми катионных заместителей на периферии молекулы.

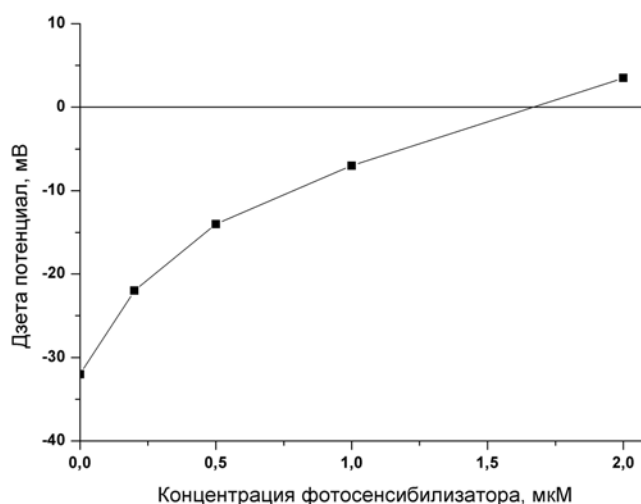


Рис. 3. Нейтрализация поверхностного заряда (дзета-потенциала) клеток *Escherichia coli* возрастающими концентрациями фотосенсибилизатора октакис(холинил)-фталоцианина цинка.

В заключение отметим, что фотодинамическая инактивация микроорганизмов может являться перспективным методом терапии инфекций, вызванных полирезистентными бактериальными штаммами, а также применяться в целях фотообеззараживания различных предметов и сред медицинского назначения.

Литература

1. Jori G., Brown S.B. Photosensitized inactivation of microorganisms. *Photochem Photobiol Sci* 2004; 3: 403-405.
2. Nitzan Y., Gutterman M., Malik Z., et al. Inactivation of gram-negative bacteria by photosensitized porphyrins. *Photochem Photobiol* 1992; 55: 89-96.
3. Raetz C.R., Ulevitch R.J., Wright S.D., et al. Gram-negative endotoxin: an extraordinary lipid with profound effects on eukaryotic signal transduction. *FASEB J* 1991; 5: 2652-2660.
4. Raetz C.R., Reynolds C.M., Trent M.S. et al. Lipid A modification systems in gram-negative bacteria. *Annu Rev Biochem* 2007; 76: 295-329.
5. Hamblin M.R., Hasan T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochem Photobiol Sci* 2004; 3: 436-450.
6. Макаров Д.А., Кузнецова Н.А., Страховская М.Г. и др. Поликатионные фталоцианины цинка и алюминия: синтез, влияние степени замещения на физико-химические свойства и фотодинамическую активность в водной среде. *Журнал физической химии* 2009; 6: 1183-1190.
7. Kuznetsova N.A., Yuzhakova O.A., Strakhovskaya M.G., et al. New heterogeneous photosensitizers with phthalocyanine molecules covalently linked to aminopropyl silica gel. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines* 2011; 15: 718-726.

Информация об авторах:

Страховская Марина Глебовна – ст. н.с. кафедры биофизики биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова, д.б.н.
Тел.: (495) 939-39-68, e-mail: maristra@yandex.ru

Никитина Валентина Васильевна – студентка кафедры биофизики биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова.
Тел.: (495) 939-39-68, e-mail: valentinacheb.ru@mail.ru

Беленикина Наталья Серафимовна – н.с. кафедры биофизики биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова, к.б.н.
Тел.: (495) 939-39-68, e-mail: nata.belenikina@ya.ru

Коваленко Илья Борисович – заведующий лабораторией молекулярного моделирования и биоинформатики ФНКЦ специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий ФМБА России, к.физ.-мат.н.
E-mail: ikovakenko78@gmail.com

Коваленко Светлана Юрьевна – н.с. лаборатории молекулярного моделирования и биоинформатики ФНКЦ специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий ФМБА России.
E-mail: zaylanka@gmail.com

Аверьянов Александр Вячеславович – заместитель генерального директора по научной работе ФНКЦ специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий, д.м.н.
Тел.: (495) 395-05-11, e-mail: averyanovav@mail.ru

Рубин Андрей Борисович – заведующий кафедрой биофизики биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова, д.б.н., профессор, член-корр. РАН.
Тел.: (495) 939-11-16, e-mail: rubin@biophys.msu.ru