

**ФОТОАКТИВИРУЕМАЯ АНТИБАКТЕРИАЛЬНАЯ ТЕРАПИЯ:
СОСТОЯНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ
PHOTOACTIVATABLE ANTIMICROBIAL THERAPY:
STATE AND PROSPECTS**

Ляшенко Людмила Сергеевна,
Минск, Республика Беларусь

Ключевые слова: фотодинамическая антибактериальная терапия, фото-воздействие, *in vitro*, трикарбоцианиновые красители

Резюме. Проведен анализ состояния и возможных перспектив в области фотоактивируемой антибактериальной терапии. Показано, что исследованные трикарбоцианиновые красители проявили антибактериальную фотоактивность для Грамм (+) и Грамм (-) бактерий, что указывает на перспективность использования этих соединений в качестве антибактериальных препаратов.

Keywords: photodynamic antibacterial therapy, photoexcitation, *in vitro*, trikarbotsianin dyes

Resume. The analysis of the prospects and potential in the field of photoactivated antimicrobial therapy are executed. It is presented the results, that investigated tricarbocyanine dyes have antibacterial photoactivity for Gram (+) and Gram (-) bacteria that specifies perspectivity of use of these dyes as antibacterial preparations.

Проблема инфекционных заболеваний остается приоритетной во многих областях медицины. Существование трудноизлечимых бактериальных инфекций значительно снижает уровень жизни населения. Рост резистентности микроорганизмов к антибиотикам стимулировал во всем мире интенсивные исследования в направлении развития альтернативных терапевтических стратегий.

Сегодня наиболее агрессивными и устойчивыми к антибактериальным препаратам являются такие широко распространенные патогены как стрептококки, стафилококки, грибы, энтерококки и т.д. Альтернативным методом, позволяющим ускорить лечение, ликвидировать возникновение побочных эффектов, часто наблюдаемых при лечении антибиотиками, является фотодинамическая антибактериальная терапия (ФДАТ). ФДАТ предполагает использование лекарственных препаратов в комбинации с воздействием лазерными источниками излучения[1]. Применение фоточувствительных препаратов, увеличивающих антимикробное действие при облучении светом лазерного источника, позволяет получить максимальный эффект лечения с минимальным инвазивным воздействием и практически безболезненно.

В настоящее время фотодинамическая антимикробная терапия использует опыт, накопленный при проведении фотодинамической терапии (ФДТ) опухолей. В течении прошлых лет фотодинамическую терапию применяли в клиническом лечении различных локализованных злокачественных и предзлокачественных образований, а также болезней кожи неракового про-

исхождения, включая псориаз, склеродерму и прыщи. При фотовоздействии на фотосенсибилизатор происходит генерация синглетного кислорода или иных активных радикалов, образование которых приводит к гибели содержащих краситель биологических структур. В отличие от темновых препаратов при фотовоздействии не существует избирательности к культурам микроорганизмов и эффективность препарата зависит лишь от эффективности проникновения фотосенсибилизатора в клетку. Кроме того, маловероятна возможность выработки бактериями иммунитета к данному типу воздействия.

Фотосенсибилизаторы различных групп, включая порфирины, производные хлорофила, фталоцианины оказались эффективны в фотоактивации гибели многих бактерий, а также паразитов, грибов и вирусов. Исследования *in vitro* показали, что антибактериальная фотодинамическая терапия обладает следующими свойствами: (а) широким спектром действия, так как один протокол облучения может быть использован для получения инактивации различных групп патогенов таких как грамположительные и грамотрицательные бактерии, дрожжи, микоплазмы и протозоа как в вегетативной, так и в кистозной стадии, (б) быстрой связью с микробными клетками, что позволяет производить облучение после короткой 5-10 мин инкубации, что гарантирует высокую селективность по сравнению с нормальными тканями, (в) высокой эффективностью фотоинактивации (регистрируется снижение микробной популяции на 5-6 порядков); (г) фоточувствительной активностью независимой от устойчивости штаммов к антибиотикам; (д) минимальным риском вызова мутагенных процессов. Большая часть предложенных антимикробных использований фотодинамической терапии базируется на данных полученных в исследованиях *in vitro*, исследования моделей инфекции *in vivo* встречаются достаточно редко. Одной из причин этого являются, вероятно, трудности в мониторинге развития инфекции и ее реакции на лечение.

Несмотря на обилие накопленных данных по применению фотоактивируемых препаратов в медицине, до сих пор нет их повседневного использования в общей практике. Используемые в клинической практике препараты имеют спектр фотодинамического воздействия с максимумами в области 620–690 нм. Проницаемость биологических тканей в этом диапазоне незначительна и составляет несколько миллиметров. Известно, что максимальная проницаемость тканей находится в дальней красной и ближней ИК области 700–1000 нм и соответствует диапазону генерации эффективных, надежно работающих и доступных лазеров [2]. Целесообразен поиск соединений, проявляющих выраженную антимикробную фотоактивность, отличающихся более простым синтезом, простотой выделения и низкой ценой. Эти соединения должны обладать хорошей растворимостью в воде и иметь максимум полосы поглощения в области максимальной проницаемости биологических тканей. Внедрение фотосенсибилизаторов, обеспечивающих эффективную генерацию синглетного кислорода в области максимальной прозрачности биотка-

ней, могло бы существенно расширить сферу применения фотодинамической антимикробной терапии.

Трикарбоцианиновые красители характеризуются максимальным поглощением света в более длинноволновой области (700–900 нм) и высоким молярным коэффициентом поглощения ($>10^5 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$), что делает их перспективным для использования в качестве фотосенсибилизаторов для фотодинамической антибактериальной терапии. В лаборатории спектроскопии НИИ прикладных физических проблем им. А.Н. Севченко проводится синтез и спектрально-люминесцентные исследования симметричных трикарбоцианиновых красителей.

Недавние исследования направлены на выявление антимикробного действия трикарбоцианиновых красителей при фотооблучении. Проведено исследование спектрально-люминесцентных характеристик трикарбоцианиновых красителей и их антибактериальной активности *in vitro*.

С целью выяснения влияния фотовоздействия на антимикробные свойства трикарбоцианиновых красителей, различающихся между собой по составу и строению, использовано излучение полупроводникового лазера с $\lambda=740$ нм, а также светодиода с $\lambda=780$ нм. Исследования фотоактивности проводились в отношении грамположительных, грамотрицательных бактерий и дрожжеподобных грибов рода кандида. Растворение химиопрепаратов, получение микробной смеси, выращивание микроорганизмов проводили по стандартной методике. Для исследований использованы соединения с одинаковым катионом и разными противоионами (Br, I, BF₄).

Для получения фототоксичного эффекта фотосенсибилизатор выдерживали с грамположительными клетками в течение 1 ч и 18 ч с грамотрицательными. Естественно, что красители не являются фототоксичными, находясь вне клетки, а некоторый период времени необходим для доставки к целям фототоксичного воздействия в клетках.

Установлено увеличение эффективности фотоинактивации бактериальных клеток с исследованными фотосенсибилизаторами при переходе от длины волны возбуждающего источника света от 740 нм к 780 нм. Кроме того, наблюдались заметно более высокие степени фототоксичности по отношению к *S. aureus*, чем к грамотрицательным *S. Enterica*. Однако, для обоих штаммов бактерий бактерицидное и фотобактерицидное воздействие исследованных красителей возрастало при увеличении времени инкубации и/или облучения.

Фотобактерицидная активность протестированных трикарбоцианинов зависит от количества фотосенсибилизатора и дозы светового облучения, а также от характеристик барьера оболочки клеток. Грамположительные клетки более чувствительны, чем грамотрицательные, хотя фототоксичность трикарбоцианиновых красителей по отношению к грамотрицательным клеткам можно повысить путем увеличения проницаемости их внешней мембраны. Наиболее фототоксичным соединением по отношению к клеткам *S. enterica* оказался краситель с противоионом Br⁻. При этом квантовый выход

образования синглетного кислорода для красителя с противоионом Br^- составляет 4,8 %, а для красителя с противоионом I^- и BF_4^- 6,1 % и 7,9 % соответственно [3]. Сопоставление фотоактивности исследованных соединений и значений выхода генерации ими синглетного кислорода демонстрирует несоответствие между этими параметрами. Это указывает на то, что механизм фотобактерицидной активности трикарбоцианиновых красителей в целом не определяется только взаимодействием с синглетным кислородом.

При сравнении эффективности исследованных фотосенсибилизаторов в фотоповреждении Грамм(+) бактерий, в частности *S. Aureus*, под действием лазерного излучения, с действием других применяемых в ФДАТ красителей, изложенные результаты по гибели микроорганизмов получены при минимальной концентрации красителей и сравнительно небольшой энергетической экспозиционной дозе света. Грамм(-) бактерии проявили резистентность к исследованным препаратам, тем не менее, удалось подавить их рост при увеличении времени инкубации фотосенсибилизаторами. Проведенное исследование показало, что синтезированные соединения составляют основу для поиска новых противомикробных препаратов.

Полученные данные свидетельствуют о целесообразности и перспективности поиска среди этой группы препаратов новых высокоактивных химиотерапевтических средств, которые найдут применение при лечении инфекционных болезней стафилококковой и грибковой этиологии[4,5]. Представляется целесообразным проведение дальнейших исследований соединений этого класса на противомикробную активность по отношению к другим микроорганизмам. Кроме того, представленные результаты исследований могут найти применение при создании новых питательных дифференциально-диагностических сред.

Список использованной литературы

1. Subramanian G, Mural R, Hoffman SL, Venter JC, Broder S. Microbial disease in humans: a genomic perspective. *Mol. Diagn* 2001;6:243 — 52.
2. Тучин, В.В. Исследование биотканей методами светорассеяния / В.В. Тучин // Успехи физических наук. — 1997. — Т. 167, № 5. — С. 517–537.
3. Влияние энергии фотона на эффективность фотохимиотерапии / М.П. Самцов, Е.С. Воропай, К.Н. Каплевский, Д.Г. Мельников, Ю.П. Истомин, Л.С. Ляшенко // Журнал Прикладной Спектроскопии. — 2009. — Т. 76, № 4. — С. 576-582.
4. Патент на изобретение № 15152. Активируемое инфракрасным светом средство подавления стафилококковой и грибковой активности. Л.П.Титов, Т.С. Ермакова, М.П. Самцов, А.П. Луговский, Д.Г. Мельников, А.А. Луговский, Е.С. Воропай, Л.С. Ляшенко; заявитель Государственное учреждение "Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии"; Белорусский государственный университет. — №а20091891; заявл. 29.12.09; опубл. 30.12. 2011 // Афіцыйны бюл. / Нац. цэнтр інтэлекту-ал. уласнасці. — 2011. №6 (83). — С.73

5. Патент на изобретение №18028. Водорастворимый индотрикарбониновый краситель в качестве фотосенсибилизатора для антимикробной фотохимиотерапии Самцов М.П., Луговский А.П., Луговский А.А., Ляшенко Л.С., Воропай Е.С., Ермакова Т.С., Титов Л.П.; заявитель Государственное учреждение "Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии"; Белорусский государственный университет. — №a20101867 от 21.12.2010 г.; опубл. 26.09.2013 г. //Афіцыйны бюл. / Нац. цэнтр інтэлектуал. уласнасці. — 2013.