

## Физико-химические свойства полиметинового красителя в модельных средах с грамположительными бактериями *Staphylococcus aureus*

А.А. Таболич, Л.С. Ляшенко, Е.И. Комар, А.Ю. Супоненко

Белорусский государственный университет

[nastya.tabolich@mail.ru](mailto:nastya.tabolich@mail.ru)

Проблема множественной лекарственной устойчивости микроорганизмов к действию широкого спектра антибиотиков, включая препараты третьего поколения, является весьма актуальной для современной медицины. Антибиотикорезистентность микроорганизмов, приводящая ежегодно к более 700 тыс. смертей, стимулировала развитие исследования в направлении поиска альтернативных терапевтических стратегий.

По данным Всемирной организации здравоохранения в список агрессивных и устойчивых к современным антибиотикам широкого спектра действия попали такие широко распространенные бактерии, как *E.coli* и *S.aureus*. У пациентов с тяжелой формой инфекций часто встречаются такие патогенные микроорганизмы как стафилококки и грибы [1].

Одним из перспективных методов, позволяющим ускорить лечение является фотодинамическая антибактериальная терапия (ФДАТ). Данный метод предполагает использование лекарственных препаратов либо фотосенсибилизаторов (ФС) в комбинации с воздействием лазерными источниками излучения [2].

Максимальная проницаемость биологических тканей находится в области 700–900 нм, следовательно, целесообразно использование при ФДАТ соединений, с максимумом полосы поглощения в области максимальной проницаемости биологических тканей и обладающих хорошей растворимостью в воде.

Для повышения эффективности ФДАТ необходимо знать каким образом краситель проникает в клетку: проникает он, используя свойства клетки, или же сама клетка в ходе развития и жизни продуцирует определенные вещества, которые выступают в роли транспортеров красителя внутрь клетки.

В данном исследовании в качестве фотосенсибилизатора использовался водорастворимый трикарбоцианиновый краситель (ПК220), синтезированный в лаборатории спектроскопии НИУ «Институт прикладных физических проблем имени А.Н. Севченко» БГУ. В использованном при измерениях спектрометрическом комплексе возбуждение спектров флуоресценции осуществлялось полупроводниковым лазером с длиной волны излучения 684 нм и мощностью на выходе 10 мВт. Для уменьшения уровня рассеянного света в приборе использовался светофильтр, пропускающий излучение с длинами волн более 720 нм [3]. Подвод возбуждающего излучения к испытуемой поверхности и сбор света флуоресценции в спектрометре осуществлялся с помощью световода.

Проводимые исследования спектрально-люминесцентных характеристик *in vitro* направлены на выявление антимикробного действия ПК220 при фотооблучении.

В данной работе в качестве питательной среды для культивирования бактерий использовался пептонно-дрожжевой бульон (ПДБ). Культивирование проводилось при температуре 37°C с непрерывным перемешиванием и аэрацией в течение 24 часов. Для проведения экспериментов по определению взаимодействия красителя с грамположительными микроорганизмами *S.aureus* были приготовлены образцы с различным составом:

1. 24-часовая культура *S.aureus* в питательном бульоне.

2. Надосадочная культуральная жидкость, которая образуется после удаления клеток микроорганизмов из питательного бульона путем центрифугирования при 7000 об/мин в течение 5 мин (т.е. питательный бульон с продуктами жизнедеятельности микроорганизмов без клеток бактерий).

3. Клетки бактерий, полученные в результате центрифугирования, отмыемые от остатков культуральной жидкости и ресуспендированные в стерильном физиологическом (изотоническом) растворе.

4. Стерильный изотонический раствор для контроля.

5. Стерильный питательный бульон для контроля.

Спектры поглощения и флуоресценции ПК в изотоническом растворе идентичны спектрам поглощения и флуоресценции ПК в воде при небольших концентрациях полиметинового красителя [4]. В водных растворах краситель присутствует в виде смеси мономеров и ассоциатов [5]. Длинноволновый максимум спектра поглощения располагается на 707 нм и не изменяет своего положение со временем, при аппроксимации Фойгтовским контуром полуширина длинноволнового пика составила 59 нм, а коротковолнового 67 нм. Максимум спектра флуоресценции располагается на 750 нм, полуширина пика составляет 25 нм.

Для исключения влияния среды были зарегистрированы спектры поглощения и флуоресценции в стерильном пептонно-дрожжевом бульоне.

Спектры поглощения и флуоресценции ПК в ПДБ зеркально-симметричны друг другу. Отсутствует зависимость расположения максимума поглощения от времени после добавления ПК. В стерильном пептонно-дрожжевом бульоне максимум поглощения света располагается на 711 нм, полуширина спектра составляет 61 нм. Максимум флуоресценции находится на 754 нм, полуширина составляет 27 нм.

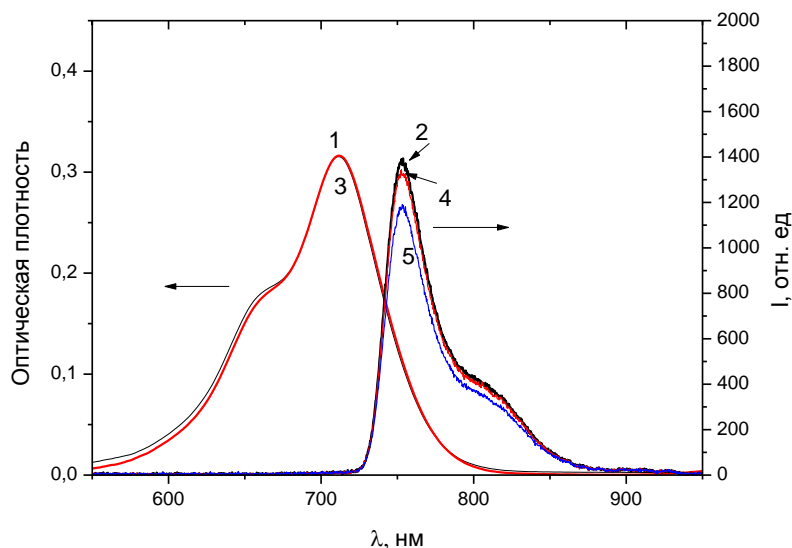


Рис. 1. Спектр поглощения ПК220 в стерильном питательном бульоне, 2 спектр флуоресценции ПК220 в стерильном питательном бульоне, 3,4 – 70 мин, 5 -120 мин в растворе

На спектрах поглощения и флуоресценции ПК 220 в ПДБ с клетками *S. aureus* (рисунок 2) заметны значительные изменения по сравнению со стерильными средами.

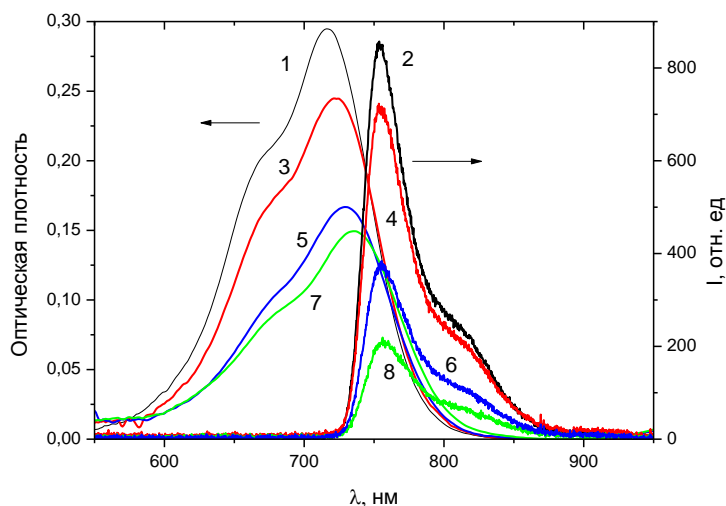


Рис. 2. Спектр поглощения ПК220 в ПДБ с клетками *S. aureus*, 2 - спектр флуоресценции ПК220 в ПДБ с клетками *S. Aureus*, 3,4-20 мин, 5,6- 70 мин, 7,8-120 мин

Сдвиг максимума спектра поглощения на 27 нм (с 716 нм до 743 нм) и падение оптической плотности свидетельствует о том, что молекулы красителя проникают через клеточную стенку бактерий находясь в ПДБ. Падение интенсивности поглощения можно связать с повторным перепоглощением агрегированного красителя или соединений, которые образуются при вхождении красителя внутрь клетки. Максимум спектра флуоресценции находится на 754 нм. Падение интенсивности флуоресценции можно объяснить фотодеструкцией ПК 220.

Из спектров поглощения и флуоресценции ПК 220 с отмытыми клетками *S. aureus* (рисунок 7 и 8) видно, что максимум смещается на 21 нм (с 711 на 732 нм). Причем с течением времени увеличивается поглощение в коротковолновом максимуме и уменьшается в длинноволновом, т.е. растет доля молекул ПК в виде ассоциатов.

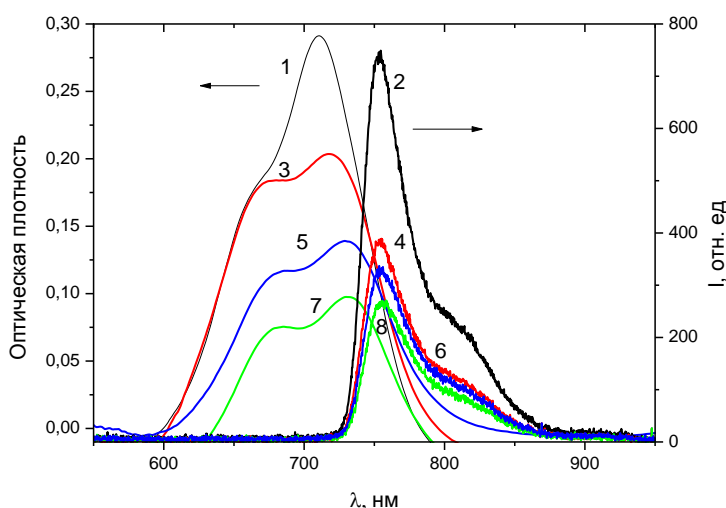


Рис. 3. Спектр поглощения ПК220 с отмытыми от ПДБ клетками *S. aureus*, 2- спектр флуоресценции ПК220 с отмытыми от ПДБ клетками *S. Aureus* - сразу после введения красителя, 3,4 -20 мин, 5,6- 70 мин, 7,8 -120 мин

В спектрах поглощения и флуоресценции ПК 220 в надосадочной культуральной жидкости (питательный бульон с продуктами жизнедеятельности микроорганизмов) наблюдается сдвиг максимума спектра поглощения на 10 нм.

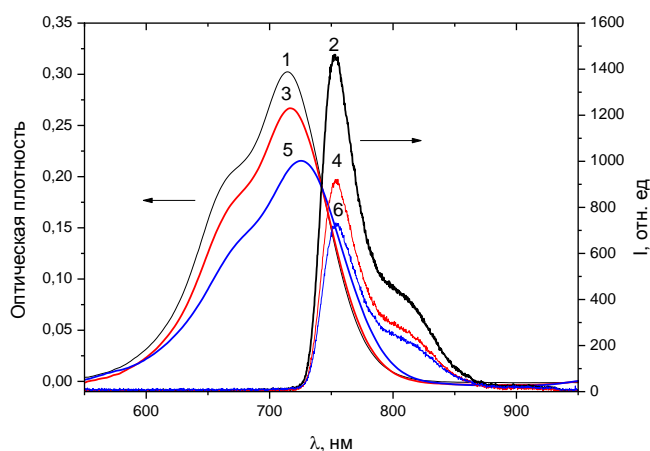


Рис. 4. Спектр поглощения ПК220 в надосадочной культуральной жидкости, 2- спектр флуоресценции ПК220 в надосадочной культуральной жидкости сразу после введения красителя, 3,4-20 мин, 5,6 - 120 мин

Установлено, что молекулы полиметинового красителя проникают через клеточную стенку бактерий, находящихся в ПДБ. Для проникновения красителя внутрь клетки грамположительных бактерий *S. aureus*, ему необходимы вещества, продуцируемые самими клетками. Это следует из спектров поглощения и флуоресценции ПК220 в физиологическом растворе с отмытыми от культуральной жидкости бактериальными клетками и спектров поглощения и флуоресценции ПК220 в надосадочной культуральной жидкости. Это может служить доказательством предположения о том, что вещества, образующиеся в процессе жизнедеятельности микроорганизмов, могут выступать в роли транспортеров красителя внутрь бактериальной клетки.

#### ЛИТЕРАТУРА:

1. Всемирная организация здравоохранения [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.who.int/ru/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>. – Дата доступа: 04.03.2021.
2. Subramanian G, Mural R, Hoffman SL, Venter JC, Broder S. Microbial disease in humans: a genomic perspective. *Mol. Diagn* 2001;6:243 —52.
3. Самцов М.П., Тарасов Д.С., Воропай Е.С., Ляшенко Л.С., Петров П.Т., Насек В.М., Савин А.О., Зильберман Р.Д. Оптимизация параметров источника фотовоздействия при фотохимиотерапии опухолевых тканей лабораторных животных. *Журнал Белорусского государственного университета. Физика*. 2019; 1:19 –26.
4. Д.С. Тарасов, М.П. Самцов, К.Н. Каплевский, Е.С. Воропай, А.П. Луговский Спектрально-люминесцентные свойства индотрикарбоцианинового красителя с полиэтиленгликолями в водных растворах // IV Конгресс физиков Беларуси (24-26 апреля 2013 г.): Сборник научных трудов. / редкол.: С.Я. Килин (гл.ред) [и др.]. – Минск : Ковчег, 2013. – 462 стр.; ил. С. 394-395.
5. Д.С. Тарасов, К.Н. Каплевский, М.П. Самцов, Е.С. Воропай Анализ спектральных свойств многокомпонентных растворов нового индотрикарбоцианинового красителя // *Вестник БГУ. Сер.1.2015, №2*. С. 9-12.