

Исследование хемилюминесцентным методом закономерностей фотоповреждения грамотрицательных бактериальных клеток, sensibilizированных индотрикарбоцианиновым красителем

А.А. Таболич^а, А.И. Третьякова^а, Л.Г. Плавская^а, Т.С. Ананич^а, Р.К. Нагорный^а, В.Ю. Плавский^а, Л.С. Ляшенко^б, Е.С. Воропай^б, А.П. Луговский^с

^а Институт физики им. Б. И. Степанова НАН Беларуси, 220072 Минск, Беларусь

^б Белорусский государственный университет, 220030 Минск, Беларусь

^с Научно-исследовательское учреждение «Институт прикладных физических проблем имени А.Н.Севченко Белгосуниверситета», 220045 Минск, Беларусь

E-mail: a.tabolich@dragon.bas-net.by

Введение. Фотодинамическая терапия (ФДТ) нашла применение для уничтожения опухолевых клеток, а также в качестве альтернативного, многообещающего метода инактивации вирусов, бактерий и грибковой флоры [1].

Одним из перспективных классов sensibilizаторов для использования в практическом здравоохранении при реализации метода ФДТ считаются индотрикарбоцианиновые (полиметиновые) красители [2].

Как отмечалось ранее [3], грамположительные бактерии *S.aureus* высокочувствительны к воздействию полиметинового красителя ПК220 после облучения, в то время как грамотрицательные бактерии *E.coli* оказались более устойчивы к фотодинамическому воздействию, при этом механизм фотохимических процессов, инициирующих фотоповреждение при их sensibilizации индотрикарбоцианиновыми красителями, остается не выясненным.

Цель настоящей работы – изучение с помощью хемилюминесцентного анализа механизмов фотодеструкции грамотрицательных бактериальных клеток *E.coli*, sensibilizированных водорастворимым индотрикарбоцианиновым (полиметиновым) красителем ПК220 при облучении светом светодиодного источника, спектральный диапазон которого соответствует полосе поглощения мономеров исследуемого красителя.

1 Материалы и методы. Объектом исследования является разрабатываемый в НИИ прикладных физических проблем им. А.Н. Севченко БГУ водорастворимый симметричный индотрикарбоцианиновый краситель ПК220.

Повреждающее действие света исследовалось в отношении кишечной палочки – грамотрицательных бактериальных клеток *Escherichia coli (E.coli)* М-17 (производства Совместного открытого акционерного общества «Ферейн», Республика Беларусь).

Облучение взвеси клеток проводили светодиодной матрицей, работающей в непрерывном режиме с максимумом в спектре испускания в области $\lambda_{\max} = 745$ нм.

Контроль плотности мощности излучения на уровне верхней поверхности столбца жидкости осуществляли с помощью измерителя РМ100D с фотодиодным датчиком S121C (Thorlabs GmbH, Германия).

Величину фотобиологического эффекта характеризовали, контролируя собственную (не усиленную) хемилюминесценцию (ХЛ) суспензии клеток, после ее предварительного облучения.

Измерения параметров свечения клеток осуществляли на хемилюминометре Lum 5773 (ДИСофт, Россия), работающем в режиме счета фотонов; спектральная чувствительность 300 ÷ 650 нм.

Для выяснения типа активных форм кислорода, участвующих в фотохимических процессах в клетках, sensibilizированных ПК220, при воздействии излучения красной области спектра, к суспензии клеток до облучения вносили один из специфических тушителей (перехватчиков) активных форм кислорода (АФК): азид натрия – тушитель синглетного кислорода; пируват натрия – перехватчик перекиси водорода; маннитол или

диметилсульфоксид (ДМСО) – перехватчики гидроксильных радикалов, а также универсальный антиоксидант кверцетин – перехватчик супероксиданионрадикала, гидроксильных радикалов, перекиси водорода и синглетного кислорода [4].

2 Результаты и их обсуждение. Выполненные исследования показали, что интенсивность ХЛ необлученных растворов 1,5 мкМ красителя ПК220, интактной суспензии микробных клеток *E.coli* (концентрации 1×10^9 мл⁻¹), а также суспензии клеток в присутствии красителя характеризуется очень низкой величиной и практически не изменяется в процессе записи сигнала в течение 5 мин (Рис. 1, а, б).

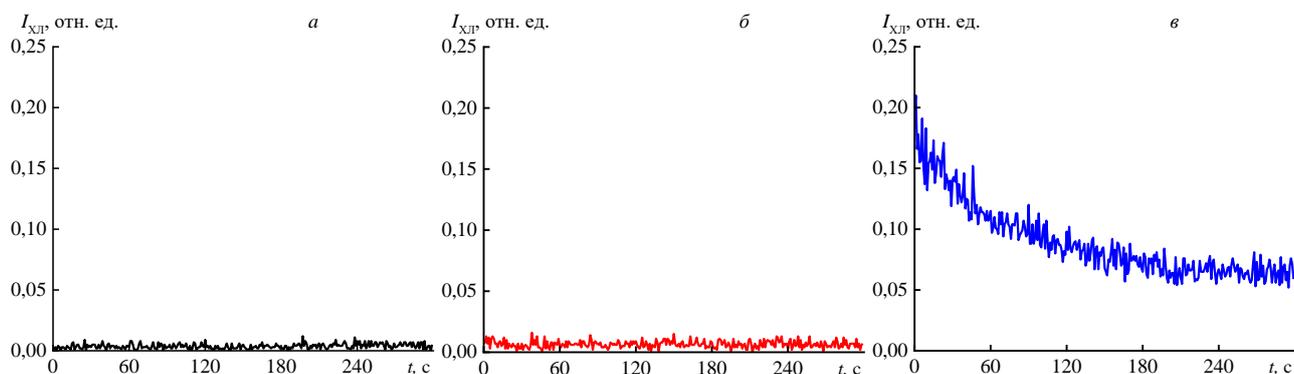


Рис. 1. Кинетические кривые изменения интенсивности хемилюминесценции суспензии клеток *E. coli* в растворе: а – в присутствии красителя ПК220 без облучения; б – после воздействия излучения в отсутствие фотосенсибилизатора ПК220; в – после воздействия излучения на суспензию клеток в присутствии красителя ПК220. Концентрация клеток 1×10^9 мл⁻¹, концентрация ПК220 1,5 мкМ; параметры светового воздействия:

$$\lambda_{\max} = 745 \text{ нм}, I = 50 \text{ мВт/см}^2, t = 3 \text{ мин}, D = 9 \text{ Дж/см}^2.$$

Иная ситуация реализуется после воздействия на суспензию клеток *E.coli*, сенсibilизированных красителем ПК220 излучения с $\lambda_{\max}=745$ нм, плотностью мощности $I = 50$ мВт/см² (энергетическая доза $D = 9$ Дж/см²) после предварительной инкубации клеток с красителем в течение времени $t = 3$ мин (Рис. 1,в). Кинетика изменения интенсивности ХЛ представляет собой ниспадающую кривую. При этом через 5 мин после начала регистрации сигнала ХЛ его интенсивность еще значительно превышает уровень необлученного контроля данной суспензии, подтверждая протекание темновых химических процессов, инициированных в исследуемой системе воздействием света.

При постоянных параметрах воздействующего излучения интенсивность светоиндуцированной ХЛ сенсibilизированных клеток заметно зависит от времени их инкубации с красителем ПК220. Оптимальное время инкубации для получения максимального сигнала хемилюминесценции составляет $t = 3$ мин.

Для проведения дальнейших исследований представляло интерес определить оптимальную концентрацию красителя ПК220 для инициирования максимального сигнала ХЛ.

В наших экспериментальных условиях светосумма ХЛ быстро увеличивается при увеличении концентрации красителя в диапазоне 0.2–1.0 мкМ, достигая максимума при $C = 1$ –2 мкМ. По всей видимости, рост интенсивности сигнала на начальном этапе зависимости светосуммы ХЛ $S_{ХЛ} = f(C)$ обусловлен увеличением числа молекул красителя, взаимодействующих с микробными клетками с соответствующим ростом актов фотоповреждения клеточных структур при облучении. После достижения максимальной светосуммы дальнейшее увеличение концентрации красителя приводит к медленному снижению сигнала ХЛ.

Для выяснения механизма фотохимических процессов в отношении клеток *E.coli*, сенсibilизированных красителем ПК 220, важно продемонстрировать взаимосвязь интенсивности ХЛ с параметрами воздействующего излучения (его плотностью мощности и экспозицией).

При исследовании зависимости светосуммы ХЛ ($S_{ХЛ}$) от времени воздействия излучения на суспензию клеток *E.coli*, сенсibilизированных красителем, при постоянной интенсивности излучения $I = 50 \text{ мВт/см}^2$, и зависимости $S_{ХЛ}$ от плотности мощности воздействующего излучения при времени воздействия $t = 3$ мин отмечено, что ход кривых зависимостей $S_{ХЛ} = f(t)$ и $S_{ХЛ} = f(I)$ несколько отличается.

Прежде всего, для зависимости $S_{ХЛ} = f(t)$ характерно быстрое увеличение ХЛ сигнала при времени воздействия $t = 1-1.5$ мин, затем скорость увеличения светосуммы ХЛ заметно падает с ростом времени воздействия до $t = 10$ мин.

Зависимость $S_{ХЛ} = f(I)$ на начальном этапе увеличения интенсивности света близка к линейной, затем по мере увеличения плотности мощности воздействующего излучения прирост светосуммы ХЛ несколько замедляется.

Тем не менее, наличие выраженной зависимости светосуммы ХЛ от энергетической дозы воздействующего излучения свидетельствует о том, что светосумма ХЛ характеризует повреждающее действие света на клетки *E.coli*, сенсibilизированные красителем ПК220.

Для выяснения типа активных форм кислорода, участвующих в фотохимических процессах в клетках *E.coli*, сенсibilизированных ПК220, при воздействии излучения красной области спектра, к суспензии клеток за 10 мин до её облучения вносили по 10 мкл одного из специфических тушителей (перехватчиков) активных форм кислорода.

Предварительные исследования показали, что добавка тушителей (перехватчиков) АФК к суспензии микробных клеток, сенсibilизированных красителем ПК220, без светового воздействия практически не сказывается на интенсивности ХЛ, то есть изменение интенсивности ХЛ в течение времени записи сигнала $t = 5$ мин соответствуют Рис. 1, а.

Однако наличие некоторых из указанных тушителей (перехватчиков) АФК в суспензии клеток, сенсibilизированных ПК220, заметно сказывается на интенсивности светоиндуцированной ХЛ по сравнению с данными, полученными для таких же суспензий, не содержащих тушителей.

Из эксперимента следует, что добавление перехватчиков гидроксильных радикалов D-маннитола или ДМСО практически не сказывается на светосумме ХЛ. В то же время добавление кверцетина приводит к снижению светосуммы светоиндуцированной хемилюминесценции, регистрируемой в отсутствие тушителей, более, чем в 3,5 раза. Добавление азида натрия – тушителя $^1\text{O}_2$ перед облучением клеток снижает светосумму светоиндуцированной хемилюминесценции более чем в 1,8 раза по сравнению со светосуммой ХЛ облученных образцов в отсутствие тушителя.

Добавление перед облучением клеток перехватчика перекиси водорода (пирувата натрия) приводит к снижению в 1,4 раза интенсивности светоиндуцированной хемилюминесценции в сравнении с образцами, не содержащими тушителя.

Заключение. Выполненные исследования показали, что хемилюминесцентный метод позволяет быстро получать информацию о механизме фотоповреждения микробных клеток *E. coli*, сенсibilизированных индотрикарбоцианиновым красителем ПК220.

Синглетный кислород выступает основным интермедиатом, определяющим фотоповреждение микробных клеток *E.coli* в присутствии красителя ПК220 при воздействии излучения светодиодного источника с $\lambda_{\text{max}} = 745 \text{ нм}$. Определенный вклад в фотохимическое повреждение микроорганизмов вносит также перекись водорода. Гидроксильные радикалы не вносят существенного вклада в фотоповреждение микробных клеток *E.coli*.

Снижение светосуммы хемилюминесценции с увеличением концентрации красителя может быть обусловлено несколькими причинами: экранированием самим красителем хемилюминесцентного сигнала, тушение красителем активных форм кислорода, генерируемых при фотовозбуждении ПК220, нехваткой молекулярного кислорода,

участвующего в процессах фотодеструкции микробных клеток вследствие его «выгорания» при взаимодействии с фотосенсибилизатором.

Литература.

1. Lugovski A. A., Samtsov M. P., Kaplevsky K. N., Tarasau D.S., Voropay E. S., Petrov P. T., Istomin Y.P. /Novel indotricarbocyanine dyes covalently bonded to polyethylene glycol for theranostics // J. Photochem. Photobiol. A-2016. - Vol. 316, № 1. - P. 31–36.
2. Ishchenko A. A., Syniugina A. T. /Structure and Photosensitizer Ability of Polymethine Dyes in Photodynamic Therapy:A Review//Theor. Exp. Chem. -2023. - Vol. 58, № 6. - P. 373–401.
3. Таболич, А.А. Сравнительный анализ физико-химические свойства полиметинового красителя в модельных средах с грамположительными и грамотрицательными бактериями / А.А.Таболич, Л.С.Ляшенко, А.Ю.Супоненко // тез. докл. XVIII Междунар. науч. конф. молодых ученых Молодежь в науке - 2021. В 2 ч. Ч. 2 Медицинские, физико-математические, физико-технические науки, химии и науки о Земле, 27-30 сентября 2021 г. / Нац. акад. наук Беларуси, Совет молодых ученых; ред.: В. Г.Гусаков [и др.]. – Мн, Беларуская навука 2021. – С. 184–185.
4. Владимиров Ю.А. Свободные радикалы и клеточная хемилюминесценция / Ю.А. Владимиров, Е.В. Проскура // Успехи биол. химии. - 2009. - Т. 49. - С. 341-388.

Деактивация триплетных состояний металлопорфиринов в растворах с молекулярным кислородом

А.Ю. Ильин, А.С. Старухин, Т.А. Павич

*Институт физики имени Б.И. Степанова НАН Беларуси, 220072, Минск, проспект
Независимости 68-2
E-mail: a.ilin@ifanbel.bas-net.by*

Соединения с порфириновыми макроциклами широко применяются в различных областях науки, техники и медицины. Указанные молекулярные системы широко используются для создания эффективных фотопреобразователей и элементов электронных устройств, а также применяются в качестве фотосенсибилизаторов в фотодинамической и антимикробной терапии. При фотовозбуждении порфириновых хромофоров происходит переход молекул в возбужденные синглетные состояния и затем после быстрой релаксации молекулы переходят в основное состояние [1,2].

В настоящей работе выполнены измерения времен жизни триплетных состояний для металлокомплексов 2,3,7,8,12,13,17,18-октаэтилпорфирина (М-ОЕР) и 5,10,15,20-тетрафенилпорфирина (М-ТРР), где М – Pt(II), Pd(II) в ряде органических растворителей. На Рис. 1 представлены структурные формулы исследованных соединений.



Рис. 1. Структурные формулы исследованных соединений: М-ОЕР (а) и М-ТРР (б).