

Фотосенсибилизирующее действие амфотерицина В в отношении штамма бактерий *Escherichia coli* М-17

Р. К. Нагорный, А. В. Микулич, Т. С. Ананич, Н. Д. Прокопенко,
А. Н. Собчук, А. И. Третьякова, Л. Г. Плавская, С. В. Якимчук,
И. А. Леусенко, А. Л. Шмитко, В. Ю. Плавский

Институт физики им. Б. И. Степанова НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
e-mail: r.nagorny@ifanbel.bas-net.by

Установлено, что противогрибковый антибиотик амфотерицин В может использоваться в качестве фотосенсибилизатора за счет образования синглетного кислорода под действием излучения синей области спектра. Определены параметры оптического излучения (длина волны $\lambda = 403$ нм, плотность мощности – 65,0 мВт/см², доза – 39,0 Дж/см²), обеспечивающие полную инактивацию клеток модельного штамма бактерий *Escherichia coli* М-17 при исходном титре в суспензии $1,5 \times 10^6$ КОЕ/мл.

Ключевые слова: амфотерицин В; фотосенсибилизатор; антибиотикорезистентность; фотодинамическая терапия; *Escherichia coli* М-17

Photosensitizing effect of amphotericin B against the bacterial strain *Escherichia coli* M-17

R. K. Nahorny, A. V. Mikulich, T. S. Ananich, N. D. Prokopenko, A. N. Sobchuk,
A. I. Tretyakova, L. G. Plavskaya, S. V. Yakimchuk, I. A. Leusenko,
A. L. Shmitko, V. Y. Plavskii

B. I. Stepanov Institute of Physics of the NAS of Belarus, Minsk, Belarus,
e-mail: r.nagorny@ifanbel.bas-net.by

It has been established that the antifungal antibiotic amphotericin B can be used as a photosensitizer due to the formation of singlet oxygen under the influence of radiation from the blue spectral region. The parameters of optical radiation (wavelength $\lambda = 403$ nm, power density – 65,0 mW/cm², dose – 39,0 J/cm²) that ensure complete inactivation of cells of the model bacterial strain *Escherichia coli* M-17 with an initial titer in the suspension of $1,5 \times 10^6$ CFU/ml have been determined.

Keywords: amphotericin B; photosensitizer; antibiotic resistance; photodynamic therapy; *Escherichia coli* M-17

Введение

Интенсивное использование антибиотиков в медицине и сельском хозяйстве привело к широкому распространению устойчивых к ним штаммов патогенных микроорганизмов, что в настоящее время является причиной смерти 700 000 человек в год с тенденцией увеличения ежегодного числа жертв до 10 миллионов к 2050 году в случае непринятия экстренных мер. Поэтому разработка новых способов подавления патогенных микроорганизмов является важнейшей задачей медицины [1, 2].

Одним из перспективных методов повышения антимикробного действия антибиотиков является использование их в качестве фотосенсибилизаторов.

Преимуществами данного подхода являются отсутствие механизмов резистентности у патогенных микроорганизмов к повреждающему действию активных форм кислорода (АФК), образующихся в результате действия оптического излучения на фотосенсибилизатор, и возможность расширения сферы применения препаратов [3, 4]. Например, противогрибковый антибиотик амфотерицин В, при его использовании в качестве фотосенсибилизатора, может быть применен в лечении гнойных и инфицированных ран, характеризующихся поражением как грибковой, так и бактериальной этиологии.

Цель настоящей работы – изучение фотосенсибилизирующего действия противогрибкового антибиотика амфотерицина В в отношении модельного штамма бактерий *Escherichia coli* М-17.

1. Материалы и методы

В исследованиях применяли суточную культуру *E. coli* М-17, выращенную в жидкой питательной среде «Бульон питательный» по ТУ ВУ 190612056.162-2011 до титра колониеобразующих единиц (КОЕ) $1,0 \times 10^8$ КОЕ/мл, который устанавливали чашечным методом Коха [5]. Культуру трижды осаждали путем центрифугирования (5 мин, 6000 об/мин) и ресуспендировали в физиологическом растворе с получением титра $1,5 \times 10^6$ КОЕ/мл. Изучение фотодинамического действия амфотерицина В в отношении штамма бактерий *E. coli* М-17 осуществляли с использованием лазерного источника с максимумом испускания на длине волны $\lambda = 403$ нм. Облучение суспензии с титром клеток *E. coli* М-17 $1,5 \times 10^6$ КОЕ/мл объемом 1,0 мл проводили в кварцевых кюветах размером $10 \times 10 \times 40$ мм.

Величину фотобиологического эффекта характеризовали, контролируя число КОЕ штамма бактерий *E. coli* М-17 и собственную хемилюминесценцию клеток в суспензии после предварительного облучения. Хемилюминесцентным методом определяли участие АФК (супероксиданион-радикал, перекись водорода и гидроксильный радикал), локализованных во внеклеточном и внутриклеточном пространстве, в фотоповреждении клеток [6]. Параметры свечения клеток штамма бактерий *E. coli* М-17 измерены на хемилюминометре Lum 5773 (ДИСофт, Россия) в режиме счета фотонов через 24 с после прекращения облучения при 22 °С и спектральной чувствительности 300 – 650 нм. Сигнал хемилюминесценции оценивали по светосумме ($S_{\text{хл}}$) – площади под кривой интенсивности свечения в течение 5 мин после начала регистрации. Для определения типа АФК к суспензиям клеток за 10 мин до облучения добавляли по 11,0 мкл одного из тушителей АФК: азида натрия – тушителя синглетного кислорода, пирувата натрия – перехватчика перекиси водорода, маннитола – перехватчика гидроксильных радикалов. Тушители вносили в суспензии клеток с красителем до концентраций 10,0 мМ для азида натрия и пирувата натрия, 40,0 мМ для маннитола. Суспензии клеток с тушителями и перехватчиками АФК облучали в течение 3 мин ($\lambda = 403$ нм, плотность мощности 50,0 мВт/см²) и оценивали их влияние на светосумму.

2. Результаты и обсуждение

Установлено, что оптическое излучение с длиной волны $\lambda = 403$ нм оказывает выраженное ингибирующее действие на культуру *E. coli* М-17 за счет эндогенных фотосенсибилизаторов. Титр клеток исследуемого штамма бактерий снижался в

результате облучения при плотностях мощности излучения 65,0 и 130,0 мВт/см² за 40 минут на 73,3 % и 98,7 %, соответственно (рис. 1).

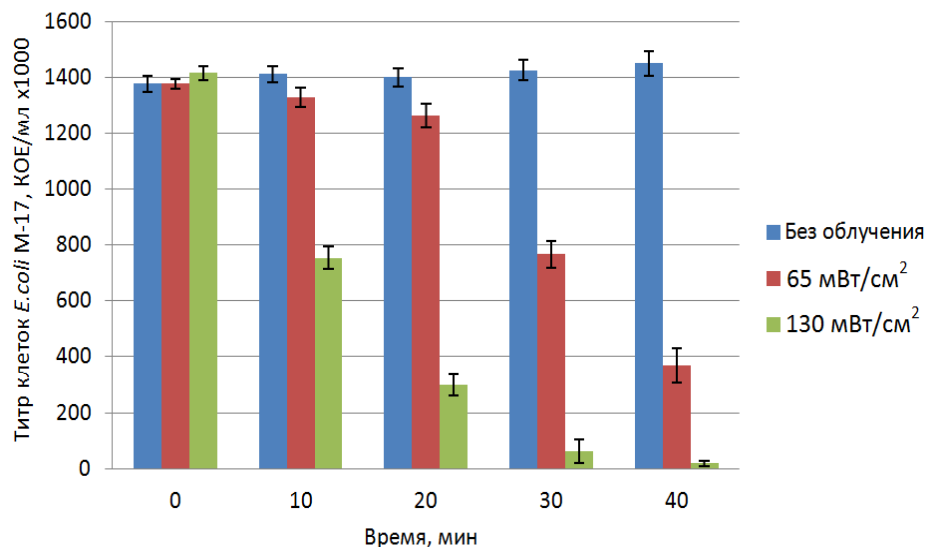


Рис. 1. Динамика титра жизнеспособных клеток штамма *E. coli* М-17 в результате действия оптического излучения $\lambda = 403$ нм при плотностях мощности 65,0 и 130,0 мВт/см²

Оценена эффективность применения амфотерицина В (10,0 мг/л) в качестве фотосенсибилизатора совместно с оптическим излучением ($\lambda = 403$ нм) с плотностью мощности 65,0 мВт/см². Показано, что сочетание антибиотика и излучения позволяет существенно усилить инактивацию культуры *E. coli* М-17 – снижение числа КОЕ на 96,7 % наблюдалось через 10 минут воздействия (рис. 2).

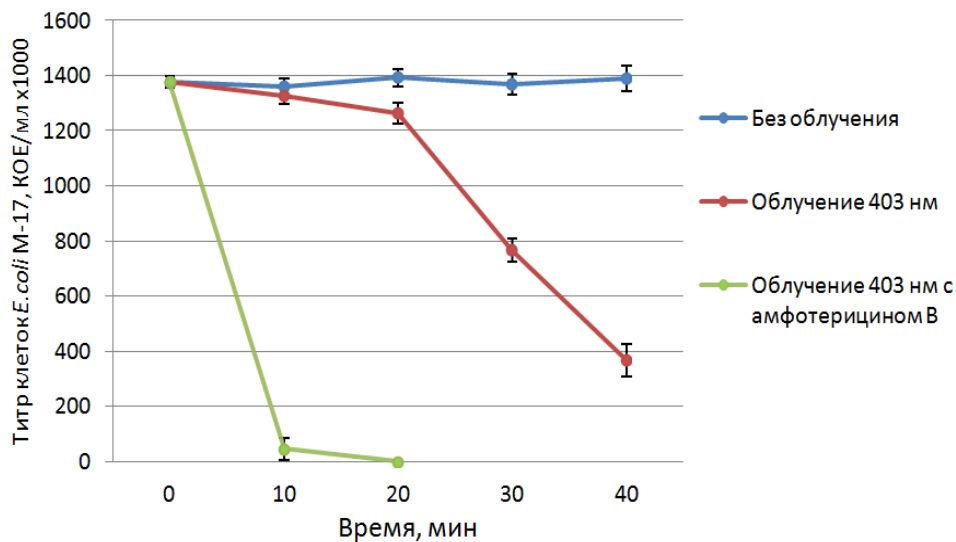


Рис. 2. Динамика титра жизнеспособных клеток штамма *E. coli* М-17 в результате действия оптического излучения $\lambda = 403$ нм при плотности мощности 65 мВт/см² и действия излучения в присутствии амфотерицина В

Для выяснения механизма фотохимических процессов, сенсibilизированных амфотерицином В, изучена динамика изменения светосуммы хемилюминесценции в зависимости от плотности мощности воздействующего излучения (рис. 3).

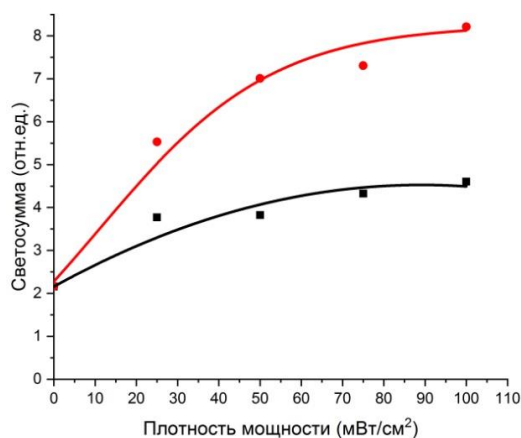


Рис. 3. Зависимость светосуммы хемилюминесценции от плотности мощности излучения ($\lambda = 408$ нм), воздействующего в течение $t = 3$ мин на суспензию клеток *E. coli* M-17 (1) и *E. coli* M-17 с амфотерицином В (2)

Для обеих суспензий характерно быстрое увеличение светосуммы хемилюминесценции до плотности мощности излучения $50,0 \text{ мВт/см}^2$ и падение скорости увеличения сигнала с увеличением интенсивности излучения до $100,0 \text{ мВт/см}^2$, что, вероятно, связано с конкуренцией двух процессов: светоиндуцированного образования первичных и вторичных АФК при фотовозбуждении амфотерицина В (кривая 2) и эндогенных красителей (кривая 1), а также тушения АФК при их взаимодействии с клетками и водой.

Исследовано влияние специфических тушителей (перехватчиков) АФК на величину фотобиологического эффекта (рис. 4).

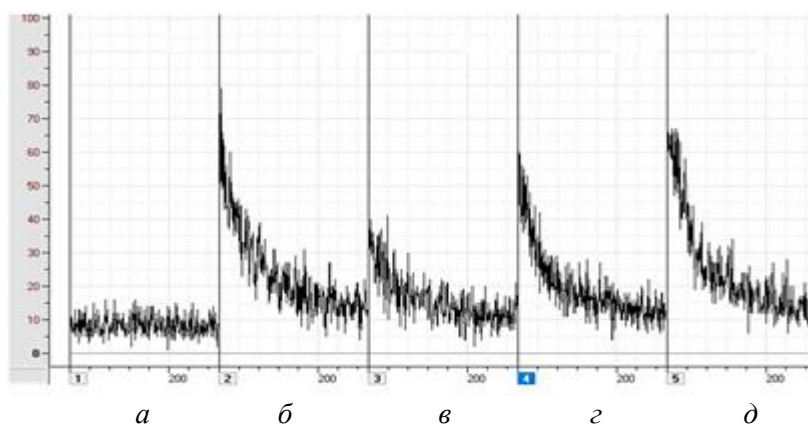


Рис. 4. Влияние тушителей АФК на хемилюминесценцию суспензии клеток *E. coli* с амфотерицином В:

- а) клетки *E. coli* с амфотерицином В до облучения;
- б) клетки с амфотерицином В после облучения;
- в) клетки с амфотерицином В после облучения в присутствии 10 мМ азида натрия;
- г) клетки с амфотерицином В после облучения в присутствии 10 мМ пирувата натрия;
- д) клетки с амфотерицином В после облучения в присутствии 40 мМ маннитола.

Внесение азида натрия в суспензию клеток с амфотерицином В перед облучением привело к снижению светосуммы хемилюминесценции (в облученных в присутствии амфотерицина В образцах светосумма хемилюминесценции превышала соответствующий сигнал для образцов, облученных в присутствии как амфотерицина В, так и азида натрия, в 2 раза), что свидетельствует о роли синглетного кислорода в фотосенсибилизированном повреждении клеток *E. coli* M-17.

Кинетические кривые хемилюминесценции образцов, облученных в присутствии маннитола, практически не отличаются от варианта облучения суспензии клеток без добавок, что свидетельствует об отсутствии вклада гидроксильных радикалов в повреждение клеток. Внесение в облучаемую суспензию перехватчика перекиси водорода пирувата натрия показало, что вклад данного типа АФК в фотоповреждение микробных клеток слабо выражен.

Заключение

Исследование фотосенсибилизирующего действия амфотерицина В в отношении штамма бактерий *E. coli* M-17 позволило установить, что данный антибиотик может использоваться в качестве фотосенсибилизатора за счет образования синглетного кислорода под действием излучения синей области спектра. Оптимизированы параметры оптического излучения (длина волны $\lambda = 403$ нм, плотность мощности – $65,0$ мВт/см², энергетическая доза – $39,0$ Дж/см²) и концентрация фотосенсибилизатора ($10,0$ мг/л), обеспечивающие инактивацию культуры *E. coli* M-17. Полученные данные могут быть использованы для создания новых подходов в лечении комбинированных инфекционных поражений с применением амфотерицина В.

Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (проект Ф25В-010).

Библиографические ссылки

1. Larsson D. G. J., Flach CF. Antibiotic resistance in the environment // Nat. Rev. Microbiol. 2022. Vol. 20. P. 257–269.
2. Bacterial antibiotic resistance: the most critical pathogens / G. Mancuso [et al.] // Pathogens. 2021. Vol. 10, iss. 10. P. 1310.
3. Photodynamic disinfection and its role in controlling infectious diseases / R. T. Aroso [et al.] // Photochemical & Photobiological Sciences. 2021. Vol. 20, iss. 11. P. 1497–1545.
4. Hamblin M. R., Abrahamse H. Tetracyclines: light-activated antibiotics? // Future Med Chem. 2019. Vol. 11, iss. 18. P. 2427–2445.
5. Лысак В. В. Микробиология. Практикум: пособие / В. В. Лысак, Р. А. Желдакова, О. В. Фомина. – Мн. : БГУ, 2015.
6. Владимиров Ю. А., Проскурина Е. В. Свободные радикалы и клеточная хемилюминесценция // Успехи биол. химии. 2009. Т. 49. С. 341–388.