

Противогрибковое действие синего света, обусловленное наномолярными концентрациями эндогенных порфириновых фотосенсибилизаторов в клетках дрожжей *Candida albicans*

**А. Л. Шмитко¹⁾, А. И. Третьякова¹⁾, Р. К. Нагорный¹⁾, А. В. Микулич¹⁾,
А. Н. Собчук¹⁾, Т. С. Ананич¹⁾, Н. Д. Прокопенко¹⁾, С. В. Якимчук¹⁾,
И. А. Леусенко¹⁾, Л. Г. Плавская¹⁾, В. М. Катаркевич¹⁾, В. Ю. Плавский¹⁾,
О. А. Емельянова²⁾, Н. В. Дудчик²⁾**

¹⁾ Институт физики имени Б. И. Степанова НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
e-mail: kalern@inbox.ru

²⁾ Научно-исследовательский институт гигиены, токсикологии, эпидемиологии, вирусологии и микробиологии, Минск, Беларусь

Исследовано ингибирование роста дрожжей *Candida albicans* за счет воздействия лазерного излучения синей области спектра. Выяснено, что основным механизмом, ответственным за гибель дрожжей, является поглощение излучения эндогенными флавиновыми и порфириновыми фотосенсибилизаторами, с последующей инициацией фотохимических реакций, протекающих с участием цитотоксических активных форм кислорода. Оценка показала, что концентрация порфиринов в клетках дрожжей находится на наномолярном уровне.

Ключевые слова: фотоинактивация грибов; синий свет; эндогенные фотосенсибилизаторы; порфирины; флавины; активные формы кислорода; *Candida albicans*.

Antifungal activity of blue light mediated by nanomolar concentrations of endogenous porphyrin photosensitizers in *Candida albicans* yeast cells

**A. L. Shmitko¹⁾, A. I. Tretyakova¹⁾, R. K. Nahorny¹⁾, A. V. Mikulich¹⁾,
A. N. Sobchuk¹⁾, T. S. Ananich¹⁾, N. D. Prokopenko¹⁾, S. V. Yakimchuk¹⁾,
I. A. Leusenka¹⁾, L. G. Plavskaya¹⁾, V. M. Katarkevich¹⁾, V. Y. Plavskii¹⁾,
O. A. Emeliyanova²⁾, N. V. Dudchik²⁾.**

¹⁾ B. I. Stepanov Institute of Physics of the NAS of Belarus, Minsk, Belarus,
e-mail: kalern@inbox.ru

²⁾ Research Institute of Hygiene, Toxicology, Epidemiology, Virology and Microbiology, Minsk, Belarus

Candida albicans yeast growth was inhibited by irradiating the cells of this microorganism with blue laser light. It was found that the primary mechanism responsible for yeast death is the absorption of radiation by endogenous flavin and porphyrin photosensitizers, followed by the initiation of photochemical reactions involving cytotoxic reactive oxygen species. Evaluation revealed that the concentration of porphyrins in yeast cells is at the nanomolar level.

Keywords: photoinactivation of fungi; blue light; endogenous photosensitizers; porphyrins; flavins; reactive oxygen species; *Candida albicans*.

Введение

Актуальной в области здравоохранения является проблема, связанная с возникновением устойчивости у многих патогенных грибковых микроорганизмов к

действию антимикотических лекарственных препаратов. Кроме этого, ряд противогрибковых средств обладает токсичностью в отношении различных органов и тканей пациента, что ограничивает повышение лекарственной эффективности за счет увеличения дозы применяемых препаратов. Таким образом, имеется острая необходимость в разработке иных подходов к борьбе с болезнетворными грибами. В качестве альтернативных способов подавления патогенной микрофлоры могут выступать оптические методы.

Целью данной работы является разработка методов по применению оптического излучения синей области спектра (400 – 470 нм) для ингибирования роста патогенных дрожжевых грибов *Candida albicans* без внесения внешних фотосенсибилизаторов, а также выяснение физико-химических механизмов, ответственных за реализацию противогрибкового действия излучения указанного спектрального диапазона.

1. Материалы и методы исследования

Используемой в исследовании культурой был штамм дрожжей *Candida albicans* ATCC 10231. Для проведения фотоинактивации использовались лазерные источники. Облучение суспензий дрожжей осуществлялось через дно стандартных кварцевых кювет. Количественный учет числа выживших в ходе облучения клеток проводился путем подсчета колоний, образовавшихся после высевания облученной суспензии на агаризованные чашки Петри.

Хемилюминесцентные измерения дрожжевых суспензий, подверженных воздействию лазерного излучения на различных длинах волн, проводились сразу после облучения при помощи хемилуминометра Lum 5773 (ДИСофт, Россия), работающем в режиме счета фотонов; спектральная чувствительность 300 – 650 нм.

Запись спектров флуоресценции и возбуждения флуоресценции, а также кинетики затухания интенсивности флуоресценции экстрактов дрожжей и растворов химически чистых порфиринов и флавинов проводили в стандартных кварцевых кюветах на спектрофлуориметре Fluorolog-3 (Horiba Jobin Yvon, Inc., France).

Определение концентраций эндогенных порфиринов, локализованных внутри клеток *C. albicans*, проводилось путем сравнения значения интенсивности в спектрах флуоресценции и возбуждения флуоресценции экстрактов, приготовленных из одной и той же клеточной биомассы *C. albicans*, с интенсивностями в спектрах эталонных растворов химически чистых порфиринов. Концентрацию порфиринов в эталонных растворах определяли по значению оптической плотности, измеренной на спектрофотометре Solar UV-VIS PB 2201, на длине волны, соответствующей максимуму полосы Core порфиринов, с учетом известного коэффициента молярной экстинкции. Далее концентрация порфиринов в экстрактах дрожжей пересчитывалась на единицу внутриклеточного объема.

2. Результаты исследования и их обсуждение

Воздействие на суспензии *C. albicans* излучением с длиной волны 405 нм и 450 нм и плотностью мощности 50 – 100 мВт/см² привело к ингибированию роста клеток дрожжей, что выражалось в уменьшении числа жизнеспособных клеток при

увеличении длительности облучения при постоянной плотности мощности. Так, при воздействии излучением с длиной $\lambda = 405$ нм при энергетической дозе 600 Дж/см^2 наблюдалась гибель практически всех клеток в облученной суспензии. При одинаковых энергетических дозах наибольший эффект фотоингибирования был всегда выше при воздействии излучением с длиной волны 405 нм по сравнению с 450 нм.

Измерения показали, что в момент начала регистрации сигнала значение интенсивности хемилюминесценции (ХЛ) клеток, облученных на длине 405 нм, было выше по сравнению с таковым значением для суспензии, облученной на 450 нм (рис. 1). Известно, что интегральная интенсивность ХЛ (равной площади под кинетическими кривыми затухания ХЛ) количественно отражает протекание фотохимических реакций, в том числе с участием активных форм кислорода (АФК), оказывающих деструктивное воздействие на клетки [1]. Сравнивая между собой интегральные интенсивности ХЛ, индуцированных облучением на различных длинах волн, становится возможным косвенно установить зависимость величины фотоингибирующего эффекта от длины волны воздействующего излучения. Значение интегральной интенсивности ХЛ суспензий *S. albicans*, инициированной излучением с длиной волны 405 нм, превышало в 1,42 раза таковое значение для ХЛ, индуцированной светом с длиной 450 нм (за вычетом интегральной интенсивности ХЛ необлученной суспензии), что коррелирует с более выраженным фотоповреждающим эффектом лазерного излучения на длине 405 нм по сравнению с 450 нм.

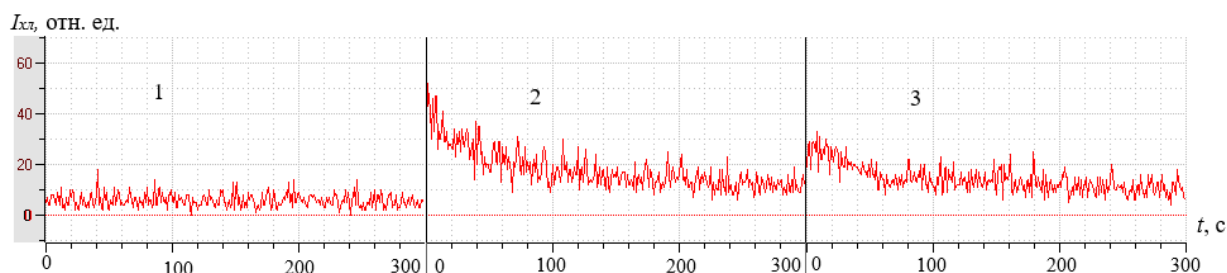


Рис. 1. Кинетика затухания хемилюминесценции дрожжей *S. albicans*: спонтанной хемилюминесценции до облучения (1), светоиндуцированной хемилюминесценции после прекращения воздействия (2, 3) импульсным лазерным излучением ($F = 100 \text{ Гц}$, $\tau = 17 \text{ нс}$) с длиной волны 405 нм (2) и 450 нм (3) со средней плотностью мощности $P = 50 \text{ мВт/см}^2$ в течение 3 мин

Установлено, что первичным процессом, инициирующим фотохимические реакции, сопровождающиеся образованием АФК, в клетках *S. albicans* является поглощение воздействующего излучения молекулами эндогенных фотосенсибилизаторов флавиной и порфириновой природы, присутствие которых в экстрактах дрожжей подтверждено спектрально-флуоресцентными методами. В спектре флуоресценции водных экстрактов дрожжей при $\lambda_{\text{ex}} = 405 \text{ нм}$ обнаружена широкая несимметричная полоса с максимумом при 532 нм, которая отнесена к флуоресценции флавинов (кривая 1, рис. 2) [2]. На длинноволновом склоне указанной полосы обнаружены плечи при 576, 610 и 673 нм. Последние два плеча могли быть компонентами порфириновой флуоресценции [2]. Пик при 470 нм обусловлен ком-

бинационным рассеянием на молекулах воды. В спектре возбуждения флуоресценции водных экстрактов при $\lambda_{em} = 532$ нм обнаружены две полосы с максимумами при 374 и 447 нм, соответственно, а также локальный минимум при 400 нм (кривая 2, рис. 2). Такое расположение экстремумов характерно для спектров поглощения водных растворов флавинов [2], что является подтверждением присутствия соединений данного типа в исследуемом экстракте.

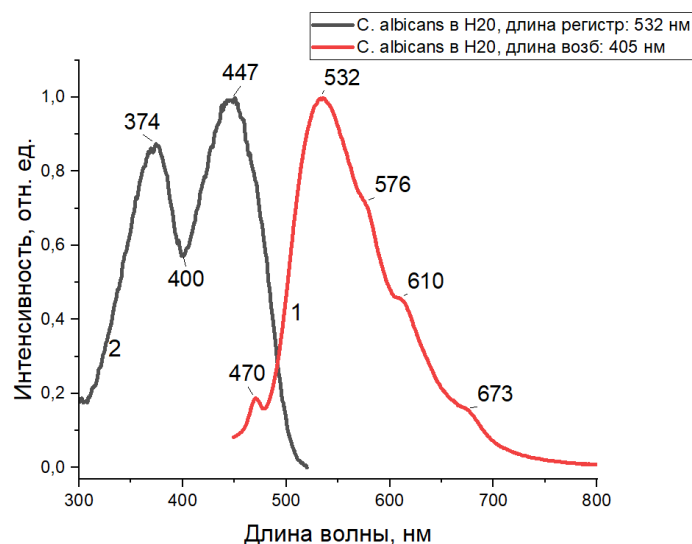


Рис. 2. Спектры флуоресценции (1) и возбуждения флуоресценции (2) водных экстрактов дрожжей *C. albicans* при $\lambda_{ex} = 405$ нм (1), $\lambda_{em} = 532$ нм (2)

В спектре флуоресценции экстракта *C. albicans* в 1 М соляной кислоте при $\lambda_{ex} = 405$ нм отсутствовала компонента, связанная с флавинами, что обусловлено тушением флуоресценции этих соединений в присутствии кислоты – это позволило зарегистрировать флуоресценцию порфиринов в красной области спектра. Так, в спектре флуоресценции кислотных экстрактов грибков при $\lambda_{ex} = 405$ нм наблюдались две полосы с максимумами при 598 и 656 нм, соответственно, что характерно для порфиринов в соляной кислоте (кривая 1, рис. 3) [2]. В спектре возбуждения флуоресценции при $\lambda_{em} = 656$ нм отчетливо наблюдалась полоса с максимумом при 404 нм (кривая 2, рис. 3), которая была идентифицирована как полоса Core, характерная для порфириновых соединений. Сравнение измеренных спектров кислотных экстрактов *C. albicans* со спектральными характеристиками растворов химически чистых порфиринов в 1 М соляной кислоте позволило сделать предположение о присутствии в клетках дрожжей копропорфирина III и протопорфирина IX. На это указывал тот факт, что в спектре возбуждения флуоресценции кислотного экстракта грибков полуширина полосы с максимумом при 404 нм имела промежуточное значение по отношению к полуширинам полос Core указанных двух порфиринов. Кинетика затухания интенсивности флуоресценции кислотного экстракта на длине волны $\lambda_{em} = 656$ нм при $\lambda_{ex} = 405$ нм аппроксимирована полиэкспоненциальной функцией с тремя компонентами. При этом время затухания одного из аппроксимирующих компонентов было равно $\tau_3 = 4,5$ нс, занимая промежуточное значение между временами затухания флуоресценции растворов

протопорфирина IX ($\tau = 4,4$ нс) и копропорфирина III ($\tau = 4,7$ нс) в 1 М соляной кислоте, также свидетельствуя о наличии смеси этих двух соединений в исследуемом экстракте.

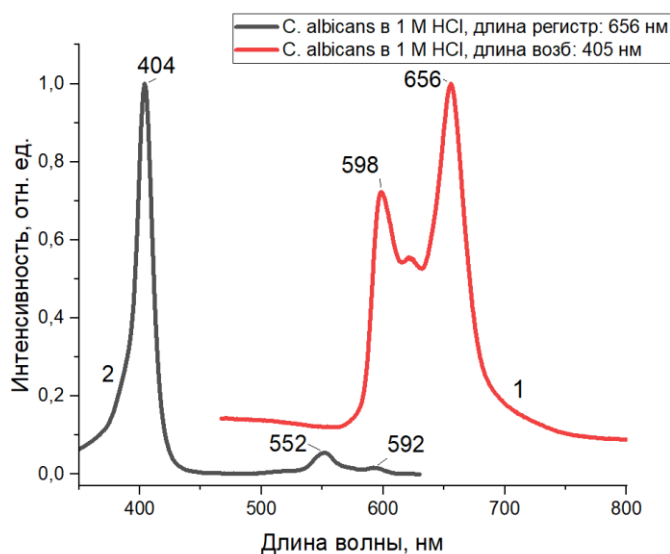


Рис. 3. Спектры флуоресценции (1) и возбуждения флуоресценции (2) экстрактов дрожжей *C. albicans* при $\lambda_{\text{ex}} = 405$ нм (1), $\lambda_{\text{em}} = 656$ нм (2)

Оценка показала, что концентрация порфиринов, содержащихся в клетках *C. albicans*, составляет $8,2 \times 10^{-9}$ моль на 1 мл внутриклеточного содержимого. Несмотря на столь малое содержание, их вклад в фотосенсибилизированную гибель клеток становится существенным при воздействии излучением с длиной волны 405 нм, соответствующей максимуму полосы Соре поглощения порфиринов и локальному минимуму поглощения флавинов. О ключевом вкладе порфиринов в эффекты фотоинактивации также говорит следующее: а) коэффициент молярной экстинкции порфиринов в синей области спектра превышает таковой для флавинов; б) значения квантовых выходов генерации синглетного кислорода для порфиринов выше, чем для флавинов; в) молекулы эндогенных порфиринов локализованы вблизи митохондрий, повреждение которых влечет за собой клеточную гибель [3]. При воздействии излучением с длиной 450 нм основной вклад в фотоинактивацию дрожжей вносят флавины, вследствие близости указанной длины волны к максимуму соответствующей полосы в спектрах поглощения данных соединений.

Библиографические ссылки

1. Эндогенные фотоакцепторы, сенсибилизирующие фотобиологические реакции в соматических клетках / Плавский В. Ю. [и др.] // Журнал прикладной спектроскопии. 2023. Т. 90, № 2. С. 239–252.
2. Porphyrins and flavins as endogenous acceptors of optical radiation of blue spectral region determining photoinactivation of microbial cells / V. Y. Plavskii, A. V. [et al.] // J. Photochem. Photobiol. B. 2018. Vol. 183. P. 172–183
3. Spectral dependence of inhibitory effect of blue light on cancer cells and efficacy of light-induced intracellular generation of reactive oxygen species in vitro / V. Y. Plavskii [et al.] // J. Biomed. Res. Environ. Sci. 2024. Vol. 5, № 11. P. 1531–1555.