

УДК 582.282.23.045

**М. Ю. Русакова**, асп.Одеський національний університет ім. І. І. Мечникова,  
кафедра мікробіології і вірусології,  
вул. Дворянська, 2, 65026, Одеса, Україна

## ФОТОСЕНСИБІЛІЗУЮЧА АКТИВНІСТЬ НОВИХ СИНТЕТИЧНИХ ПОРФІРИНІВ ЩОДО КЛІТИН *CANDIDA* *ALBICANS*

Досліджено закономірності пригнічення росту *Candida albicans* в присутності синтетичних порфіринів. Встановлено залежність ступеня інактивування від структурних особливостей досліджуваних сполук. Отримані результати розглядаються з погляду можливості використання даних речовин у якості ефективних агентів для антимікробної хіміотерапії.

**Ключові слова:** дріжджі, фотосенсибілізуюча активність, фотосенсибілізатор, порфіринові похідні.

Одноклітинні еукаріотні мікроорганізми — дріжджі — традиційно використовуються як модельна система за вивчення механізмів фотодинамічної терапії (ФДТ) на клітинному рівні [1]. Однак останнім часом подібні дослідження набувають самостійного значення у зв'язку зі зростаючою стійкістю багатьох патогенних грибів до лікарських препаратів та необхідністю пошуку нових шляхів боротьби з ними [2]. Одним з таких напрямків є фотодинамічна антимікробна хіміотерапія, яка може бути використана для лікування локальних поверхневих захворювань. Цей метод ґрунтується на ушкодженні клітин активними формами кисню, в тому числі синглетним, що генеруються сенсibilізаторами в фотозбудженому стані (фотосенсибілізуюча активність) [3]. До таких речовин відноситься ряд природних та синтетичних порфіринів [4]. Але деякі з них не потребують для прояву антимікробних ефектів попереднього збудження світлом, реалізуючи так звану темнову дію (темнову активність).

Особливий інтерес представляє пошук антигрибкових препаратів, активних щодо дріжджів роду *Candida*, до 15% видів яких можуть викликати системні та локальні кандидози [5].

Метою нашої роботи було вивчення фотосенсибілізуючої та темнової активності ряду нових синтетичних порфіринів щодо дріжджів *Candida albicans*.

### Матеріали та методи дослідження

Для досліджень використано диплоїдний штам дріжджів *Candida albicans* У-2501Т, що був отриманий з колекції культур мікроорганізмів кафедри мікробіології та вірусології ОНУ ім. І. І. Мечникова. Зберігання тест-культури здійснювали на скошеному м'ясо-пептонному агарі (МПА) в пробірках при температурі 5 °С.

В якості фотосенсибілізаторів у роботі були використані сполуки, синтезовані в ОНУ ім. І. І. Мечникова, що являють собою вільну основу мезо-тетракіс(4-N-метилпіридил)порфірину (I) та низку його металокомплексів.

Діапазон концентрацій досліджуваних речовин ( $1 \cdot 10^{-6}$  моль/л,  $1 \cdot 10^{-7}$  моль/л та  $1 \cdot 10^{-8}$  моль/л) був обраний згідно з даними літератури про фотосенсибілізуючу активність подібних сполук [6]. Робоча концентрація мікроорганізмів становила  $1 \cdot 10^6$  клітин/мл. Попередню інкубацію тест-культур зі сполуками провадили за  $37^\circ\text{C}$  протягом 30 хвилин в умовах постійного струшування. Активацію досліджуваних речовин здійснювали за допомогою лампи накаливання денного світла потужністю 500 Вт. Інтенсивність опромінення становила  $20 \text{ Вт/см}^2$  на рівні зразка [7].

Для кожного похідного експеримент повторювали двічі, кількість повторів у кожному ряду дорівнювала чотирьом. За контроль використовували суспензії неопромінених (K-) та опромінених (K+) клітин мікроорганізмів, що не містили екзогенних фотосенсибілізаторів.

Інтенсивність росту дріжджів оцінювали фотометрично при довжині хвилі 520 нм через 24 та 48 годин після опромінення.

Отримані результати опрацьовували методами варіаційної статистики з використанням критеріїв Фішера — Стьюдента, застосовуючи програму Excel-2000.

### Результати та їх обговорення

Мезо-тетракіс(4-N-метилпіридил)порфірин (I) був обраний в якості препарату порівняння як найбільш активний фотосенсибілізатор серед катіонних мезо-заміщених тетрапіролів [1, 2]. Шляхом включення до вільної основи центрального атома металу було отримано чотири нових металокомплекси:  $\text{Ni}^{2+}$  — йодид (II);  $\text{Ni}^{2+}$  — тозілат (III);  $\text{Zn}^{2+}$  — йодид (IV);  $\text{Zn}^{2+}$  — тозілат (V). За характером росту контрольних та опромінених культур спостерігали на протязі двох діб.

Результати, отримані при вивченні фотоіндукованої фунгіцидної активності сполук, представлені на рис. 1. За характером росту контрольних та дослідних культур *C. albicans* спостерігали протягом двох діб з реєстрацією оптичної густини суспензії клітин через 24 і 48 годин.

Суттєву затримку росту кандіди за дії двох менших концентрацій ( $1 \cdot 10^{-8}$  моль/л та  $1 \cdot 10^{-7}$  моль/л) спостерігали за добу після опромінення лише у випадку сполуки V. При використанні порфіринів у більший дозі ( $1 \cdot 10^{-6}$  моль/л) інгібуючий вплив виявили всі металокомплекси. При цьому затримка росту дріжджових клітин, що були опромінені в присутності III, IV і V, склала відповідно 72, 83 і 80%. Ефективність II була меншою — зниження інтенсивності росту культур у цьому випадку дорівнювало лише 50% в порівнянні з контролем. Такі ж тенденції прояву фотоіндукованої фунгіцидної активності металокомплексів спостерігаються і через 48 годин. Крім того, через дві доби антигрибкову дію проявляє також вільна основа (I): в концентрації  $1 \cdot 10^{-7}$  моль/л вона інгібує ріст *C. albicans* на 28%, а в концентрації  $1 \cdot 10^{-6}$  моль/л —

приблизно у 2 рази. Отримані результати дозволяють зробити припущення про те, що ця сполука викликає в клітинах дріжджів зміни, які виявляються лише в наступних поколіннях.

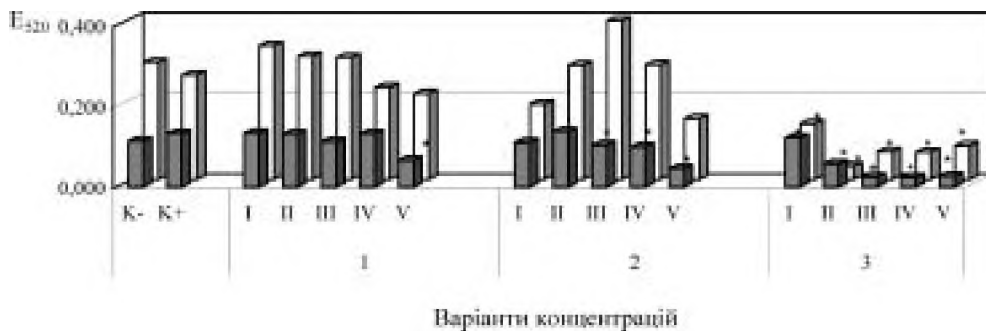


Рис. 1. Вплив синтетичних похідних порфіринів на чутливість дріжджів *C. albicans* до дії опромінення:

K- — суспензія неопромінених клітин, K+ — суспензія опромінених клітин;  
 1 —  $1 \cdot 10^{-8}$  моль/л, 2 —  $1 \cdot 10^{-7}$  моль/л, 3 —  $1 \cdot 10^{-6}$  моль/л досліджуваних речовин.  
 I — мезо-тетракис(4-N-метилпіридил)порфірин; металокомплекси:  
 II —  $\text{Ni}^{2+}$  — йодид, III —  $\text{Ni}^{2+}$  — тозілат, IV —  $\text{Zn}^{2+}$  — йодид, V —  $\text{Zn}^{2+}$  — тозілат.  
 ■ — I доба, □ — II доба. \* —  $P < 0,05$  порівняно з контролем.

Співставлення структури досліджених синтетичних порфіринів з їх активністю свідчить про більш значну ефективність  $\text{Zn}^{2+}$ -вміщуючих комплексів у порівнянні з  $\text{Ni}^{2+}$ -вміщуючими. Ці дані узгоджуються з даними про активність цинкових комплексів тетрапіролів за умов ФДТ пухлин [8]. Одержані результати свідчать про більш високу активність металокомплексів, що містять в якості протиіона тозілат. Відповідні йодиди менш ефективні.

За використання різних сполук у якості сенсibilізаторів одним з найбільш важливих параметрів, що враховується поряд з високою фотоіндукованою активністю, є низький рівень темної токсичності. Одночасне врахування цих характеристик дозволяє уникнути багатьох побічних ефектів, пов'язаних з дією цих речовин без попереднього фотоактивування.

Визначення темної токсичності досліджених тетрапіролів проводили за умов культивування дріжджів протягом 24 та 48 годин і постійної наявності в середовищі сполук у заданих концентраціях. Результати цих дослідів представлено на рис. 2. Дві менші концентрації не проявляли дії протягом першої доби, і лише через 48 годин спостерігалася помірна затримка росту в деяких випадках.

Найбільший інгібуючий ефект (зниження інтенсивності росту до 35%) спостерігали після застосування сполуки V. В концентрації  $10^{-6}$  моль/л темнова дія порфіринів більш виражена, але в окремих випадках (сполуки I і V) мала різноспрямований характер: від стимуляції росту *C. albicans* через 24 години до інгібування за подальшого культивування ще протягом доби.

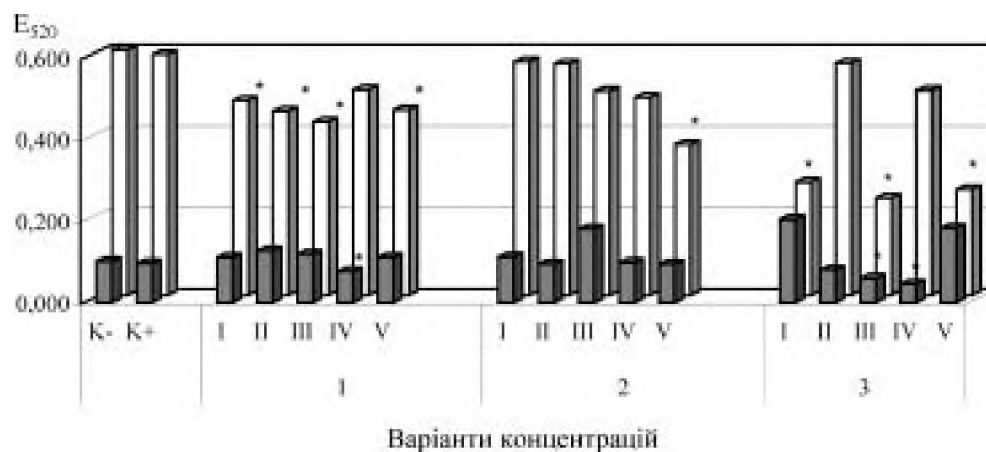


Рис. 2. Темнова активність синтетичних порфіринів щодо дріжджів *C. albicans*: К- — суспензія неопромінених клітин, К+ — суспензія опромінених клітин; 1 —  $1 \cdot 10^{-8}$  моль / л, 2 —  $1 \cdot 10^{-7}$  моль / л, 3 —  $1 \cdot 10^{-6}$  моль / л досліджуваних речовин. I — мезо-тетракіс(4-N-метилпіридил)порфірин; металокомплекси: II —  $\text{Ni}^{2+}$  — йодид, III —  $\text{Ni}^{2+}$  — тозілат, IV —  $\text{Zn}^{2+}$  — йодид, V —  $\text{Zn}^{2+}$  — тозілат. ■ — I доба, □ — II доба. \* —  $P < 0,05$  порівняно з контролем.

Підсумовуючи одержані результати, можна зробити висновок про можливість використання дріжджових клітин в якості модельних систем для дослідження нових фотосенсибілізаторів та механізмів їх дії. Вони також свідчать про доцільність подальшого вивчення синтетичних порфіринів, зокрема їх цинк-вміщуючих комплексів, не тільки як фотосенсибілізаторів в ФДТ пухлин, але й як потенційних препаратів для лікування локальних кандидозів.

### Висновки

1. Досліджувані ксенобіотики порфіринової природи проявляють значний інгібуючий вплив на ріст культури *Candida albicans* за умов попередньої активації цих сполук денним світлом.
2. Найбільша фотодинамічна активність властива тозілату цинкового комплексу мезо-тетракіс(4-N-метилпіридил)порфірина.
3. Всі випробувані сполуки не виявляли виразної інгібуючої дії без попереднього опромінення видимим світлом досліджуваних клітин *Candida albicans*.

### Література

1. Миронов А. Ф. Фотодинамическая терапия рака / Успехи химии порфиринов. Т. 1. Под ред. проф. О. А. Голубчикова. — Санкт-Петербург: Изд-во НИИ Химии СПбГУ, 1997. — С. 357–374.
2. Покровский В. Г. Медицинская микробиология. — Москва: Медицина, 1999. — С. 250–253.
3. Владимиров Ю. А., Потапенко А. Я. Физико-химические основы фотобиологических процессов. — М.: Высшая школа, 1989. — 128 с.
4. T. D. Mody, J. L. Sessler. Porphyrin- and Expanded Porphyrin-based Diagnostic and Therapeutic Agents. — Ch. 7; Supramolecular Technology. Edited by D. N. Reinhoudt: John Wiley & Sons Ltd., 1999. — P. 245–294.

5. Квасников Е. И., Щелокова И. Ф. Дрожжи. Биология. Пути использования. — Киев: Наукова думка, 1991. — 328 с.
6. Страховская М. Г., Шумарина А. О., Иванова Э. В., Фрайкин Г. Я. Инактивация дрожжей *Candida guilliermondii* видимым светом при индуцированном синтезе эндогенных порфиринов // Микробиология. — 1998. — Т. 67, № 3. — С. 360–363.
7. Страховская М. Г., Иванова Э. В., Колесникова О. А. Влияние 2,2-дипиридила на накопление протопорфирина IX и его производных в митохондриях и плазматических мембранах дрожжей // Биохимия. — 1999. — Т. 64, № 2. — С. 262–266.
8. Верле Д., Гирт А., Богдан-Рай Т. Фотодинамическая терапия рака: второе и третье поколение фотосенсибилизаторов // Известия АН. Серия химическая. — 1999. — Т. 137, № 5. — С. 836–845.

### М. Ю. Русакова

Одесский национальный университет им. И. И. Мечникова,  
кафедра микробиологии и вирусологии,  
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65026, Украина

### ФОТОСЕНСИБИЛИЗИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ НОВЫХ СИНТЕТИЧЕСКИХ ПОРФИРИНОВ ПО ОТНОШЕНИЮ К КЛЕТКАМ CANDIDA ALBICANS

#### Резюме

Исследованы закономерности действия синтетических порфиринов на рост *C. albicans* при облучении культуры видимым светом и в темновых условиях. Установлена зависимость влияния структурных особенностей молекул веществ на степень инактивации клеток. Полученные результаты рассматриваются с точки зрения применения подобных соединений в фотодинамической антимикробной химиотерапии, а также использования культуры *C. albicans* в качестве тест-объекта для оценки фотосенсибилизирующей эффективности веществ.

**Ключевые слова:** тест-культуры, фотосенсибилизирующая активность, фотосенсибилизатор, порфириновые производные.

### M. Yu. Rusakova

I. I. Mechnikov Odessa National University,  
Department of Microbiology and Virology  
Dvoryanskaya str., 2, Odessa, 65026, Ukraine

### PHOTOSENSITIZER ACTIVITY OF NEW SYNTHETIC PORPHYRINES TO CANDIDA ALBICANS CELLS

#### Summary

The growth suppression of *Candida albicans* by visible light and under the dark conditions was studied to depend on the presence of the synthetic porphyrine derivatives. It was found that molecule structure peculiarities of the compounds correlate with the level of cell photoinactivation. The obtained data are discussed from the standpoint of such derivatives using in photodynamic antimicrobial chemotherapy and also this yeast system application for the assessment of the photosensitizer efficiency.

**Keywords:** test culture, photosensitizer activity, photosensitizer, porphyrine derivatives.