

УДК 782.282.23.045

М. Ю. Русакова, мол. наук. співроб., Б. М. Галкін, д-р біол. наук, проф., Т. О. Філіпова, д-р біол. наук, проф., З. І. Жиліна, д-р хім. наук, проф., Т. І. Захаркіна, студ., Г. М. Кириченко, наук. співроб. Одеський національний університет ім. І. І. Мечникова, кафедра мікробіології і вірусології, вул. Дворянська, 2, 65026, Одеса, Україна

ФОТОІНАКТИВАЦІЯ КЛІТИН *CANDIDA ALBICANS* В ПРИСУТНОСТІ СИНТЕТИЧНИХ ПОРФІРИНІВ

Визначено активність синтетичних фотосенсибілізаторів за допомогою тест-системи на основі культури *Candida albicans*, яка дозволяє оцінити не тільки рівень їх фотодинамічного впливу, а також його форму. Серед досліджуваних сполук найактивнішим був цинковий комплекс мезо-тетракіс(4-N-метилпіридил)порфірин тозилату. Дане похідне призводило до затримки поділу дріжджів протягом 24 годин та появи “ланцюгів” клітин на другу добу, що відповідає віддаленій інактивації.

Ключові слова: фотосенсибілізатор, фотодинамічна активність, *Candida albicans*, порфірини, віддалена дія.

Сьогодні синтезується велика кількість різних препаратів, які можуть бути використані для лікування онкологічних захворювань, зокрема фотодинамічної терапії [8]. Найбільш перспективними в даній галузі являються порфіринові фотосенсибілізатори (ФС), число яких стрімко зросло за останній час [4]. Це стимулює пошук доступного та недорогого способу для визначення їх активності, насамперед, сенсibiliзуючої [2]. Тест-система на основі *Candida albicans* дозволяє не просто провести відбір ефективних ФС, але й визначить форму їх впливу [7].

Матеріали та методи

В роботі вивчали активність сполук порфіринового ряду: вільні основи йодид (I) і тозилат (II) мезо-тетракіс(4-N-метилпіридил)порфірину та їх металокомплексів з цинком — йодид (III) і тозилат (IV). Діапазон концентрацій речовин (0,01–10 мкМ) був обраний згідно з даними літератури [3].

У експериментах використовували добову культуру *Candida albicans* ATCC 18804, робоча концентрація дріжджів становила $1 \cdot 10^6$ клітин/мл. Попередня інкубація тест-культури зі сполуками проводилася при 37 °C протягом 30 хв при постійному струшуванні. Активацію досліджуваних речовин здійснювали за допомогою лампи розжарювання потужністю 500 Вт, інтенсивність опромінення становила 20 Дж/см² на рівні зразка.

Інтенсивність росту дріжджів оцінювали фотометрично через 24 та 48 годин після опромінення. Контролем слугувала суспензія опромінених клітин мікроорганізмів, що не містила екзогенних ФС.

Для вивчення відстроченої дії досліджених ФС після опромінювання клітинної суспензії використовували метод мікроколоній. На препаратах, зафіксованих після 24-48 годин інкубації, визначалася відносна кількість мікроколоній, що містять певне число клітин. В різних точках препаратів прораховувалося 1000–1500 мікроколоній. Брунька приймалася за окрему клітину. Мікроколонії, що складаються з 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7–12, 13–24, 49–99, 100–200 і більш ніж 200 клітин, відносилися до різних класів. Останні шість класів об'єднували колонії, що виникли внаслідок трьох і більшого числа циклів розмноження початкової клітини [1].

Результати та їх обговорення

При вивченні фотосенсибілізаторів основним критерієм скринінгу нових сполук є їх фотодинамічна активність, тобто здатність після поглинання кванта світла генерувати різні форми радикалів, тим самим викликаючи деструкцію внутрішньоклітинних структур [2, 6].

В роботі було досліджено фотодинамічну дію порфіринів на культуру *Candida albicans*, яку оцінювали за інтенсивністю росту в рідкому середовищі через 24 та 48 год після опромінення (табл.). Як видно з представлених результатів всі речовини у більшій концентрації через добу вірогідно пригнічують ріст дріжджових клітин у 1,7-4 рази. У концентраціях 0,1 та 1 мкМ суттєву активність виявляють сполуки II, III і IV, а I не впливає на ріст культури. Опромінення в присутності найменшої концентрації сполук II та IV пригнічує ріст приблизно на 40 %, в той час як похідні I і III дещо активують його. Отримані дані дають також змогу оцінити залежність структура — активність серед досліджених сполук: встановлена більш висока фотосенсибілізуюча активність порфіринів, що містять в якості противоіону тозилат (II і IV), а також більш висока активність металокомплексів (III і IV) порівняно з вільними основами.

Таблиця

Інтенсивність росту культури *Candida albicans*, ($E_{540} \cdot 10^{-3}$)

Час інкубації, години	Досліджувана сполука	Концентрація сполуки, мкМ			
		0,01	0,1	1	10
24	I	133 ± 11	109 ± 7	116 ± 15	63 ± 8*
	II	65 ± 4*	55 ± 11*	42 ± 9*	38 ± 3*
	III	132 ± 12	99 ± 5	31 ± 3*	31 ± 3*
	IV	66 ± 17*	45 ± 4*	25 ± 5*	28 ± 6
	Контроль	109 ± 7			
48	I	331 ± 28*	186 ± 17	268 ± 31	452 ± 16*
	II	152 ± 16*	143 ± 10*	327 ± 29	39 ± 2*
	III	228 ± 22	284 ± 31	146 ± 19*	89 ± 8*
	IV	213 ± 19	151 ± 14*	187 ± 20	23 ± 6*
	Контроль	237 ± 28			

Примітка: * — різниця вірогідна ($p < 0,05$) порівняно з контролем.

В основному ті ж самі закономірності виявляються і через дві доби культивування. Оптична густина культур, опромінених в присутності більшої концентрації цинкових комплексів (III і IV), залишається на рівні, що спостерігається через добу. Це свідчить про високу фотосенсибілізуючу активність даних порфіринів і, скоріше за все, про їх здібність викликати загибель клітин. Однак в деяких випадках зниження росту культури в порівнянні з контролем виражено в менший мірі ніж через 24 години. Це узгоджується з даними про відновлення з часом росту пухлин після ФДТ, що потребує додаткового опромінення без або з використанням ще однієї дози ФС.

Таким чином, цей підхід дає змогу оцінити як властивості фотосенсибілізаторів, так і реакцію сукупності клітин на їх вплив. Але в даному випадку неможливо визначити реакцію окремих клітин та встановити, чи є зниження інтенсивності росту результатом пригнічення усіх клітин, або лише деякої їх частки. Тому в подальших дослідках був використано метод мікроколоній, який дозволяє оцінити морфологічні зміни.

Дріжджові клітини контрольних проб (не підлягали дії екзогенних ФС), висіяні на голодний агар, починають утворювати бруньки при 30 °С приблизно через 60-70 хв інкубації. Незабаром процес брунькування охоплює всі клітини популяції, і до кінця 4-ої години інкубації, як правило, не залишається жодної одноклітинної форми. Після завершення першого брунькування клітини вступають в другий цикл розмноження. Двохклітинні форми перетворюються у чотирьохклітинні (рідше — трьохклітинні), “пари” перетворюються на “ланцюжки”, а потім в “гілочки” клітин. Після наступних 3-4 циклів брунькування гілочки змінюються “дисками”, типовими для тих, що нормально розмножуються на твердому живильному середовищі, дріжджових клітин плоскими колоподібними формами мікроколоній, що складаються з компактно розташованих дрібних інтенсивно вегетуючих одиниць. Подальше зростання мікроколоній, аж до макроскопічних розмірів, здійснюється у формі “дисків”.

Дія порфіринів на клітини *Candida albicans* істотно змінює динаміку їхнього брунькування на протязі 24–48 годин (рис. 1,2). Оскільки визначення активності проводилося через 24 години і 48 годин після опромінення, то отримані результати дозволяють судити і про відстрочену дію сенсибілізаторів. Представлені на рис. 1а дані демонструють різні механізми ушкоджувальної дії мезо-тетракіс(4-N-метілпіриділ)порфірин йодиду (I).

Після опромінення в присутності максимальної концентрації в препаратах через добу виявляються лише короткі ланцюжки, що складаються з 4-6 клітин, які через дві доби перетворюються на повноцінні дископодібні колонії. Таким чином, ця сполука лише на деякий час затримує поділ клітин, який відновлюється на протязі другої доби, причому з більшою інтенсивністю. Цікавим є вплив I в концентрації 0,1 мкМ. В цьому випадку майже всі колонії мають через 24 години нормальний вигляд, але через 48 годин вони представлені дисками з розірваними краями. На наш погляд це свідчить про відстрочений ефект, який проявляється в деяких клітинах наступних поколінь.

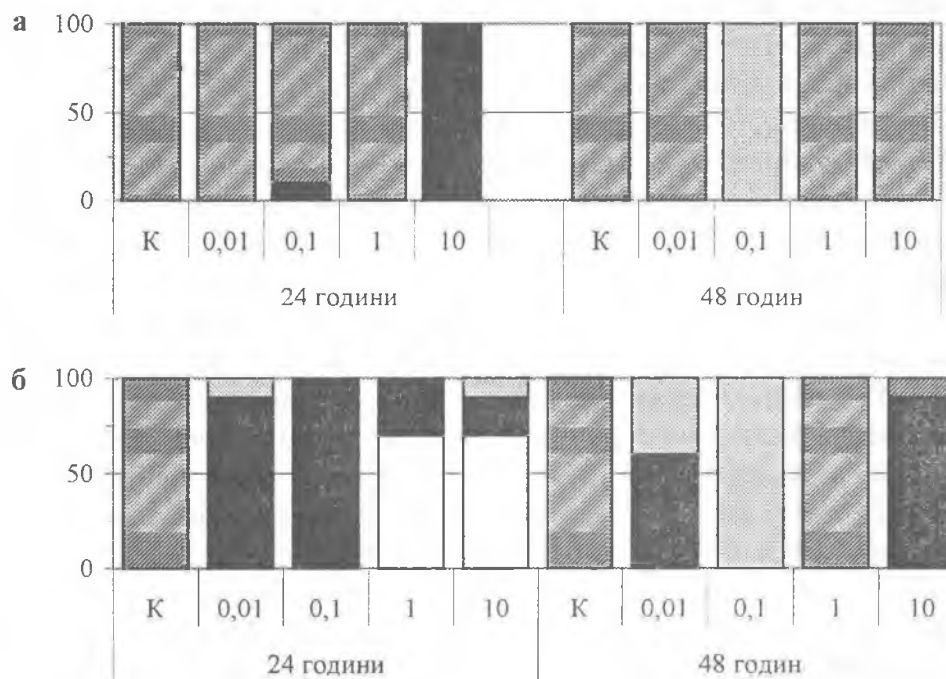


Рис. 1. Залежність різних форм інактивації клітин *Candida albicans* від часу і концентрації мезо-тетракіс(4-N-метілпіриділ)порфірин йодиду (а) та тозилату (б) в середовищі інкубації

Примітка. Тут і на рис. 2: за віссю абсцис — концентрація, мкМ; за віссю ординат — інтенсивність росту клітин мікроорганізмів в культурі, %. К — контроль; ▨ — окремі клітини; ■ — дископодібні колонії; ▩ — “ланцюжки”; □ — дископодібні колонії з розірваними краями.

Мезо-тетракіс(4-N-метілпіриділ)порфірин тозилат (рис. 1б) викликає більш значні морфологічні зміни і при концентраціях 1 та 10 мкМ 60-70 % окремих елементів представлені через добу поодинокими клітинами. Наступного дня в препаратах присутні форми, які відновили свій ріст, але у разі найбільшої концентрації виявляються практично одні ланцюжки, що вказує на значне пригнічення здібності до поділу.

Більш суттєві морфологічні зміни виявлені при дослідженні впливу цинкових комплексів (рис. 2). За умов найменшої концентрації всі колонії при використанні в якості ФС сполуки III і 40 % колоній у разі сполуки IV мали нормальний дископодібний вигляд, але були значно меншого діаметру, ніж у контролі. Співставлення цих даних з результатами одержаними в рідких культурах дозволяє припустити, що малі концентрації досліджуваних порфіринів викликають затримку поділу клітин. Через 24 години після опромінення в присутності цинквмісних порфіринів в концентраціях 1 та 10 мкМ в препаратах зустрічалися лише окремі клітини, тобто на протязі першої доби дріжджові клітини не розмножувалися. На другу добу вихідні клітини формують короткі ланцюжки, що говорить про часткове відновлення здібності до поділу. Але при найбільшій концентрації ФС ці ланцюжки настільки малі, що фотометричний метод оцінки інтенсивності

росту культур не дає змоги зареєструвати збільшення кількості клітин у середовищі (табл.).

Таким чином, проведене дослідження дозволяє рекомендувати для подальшого поглибленого вивчення в якості перспективних ФС цинкові комплекси мезо-тетракис(4-N-метілпіридил)порфірину, а дріжджові клітини в якості доступних та адекватних моделей оцінки фотодинамічних впливів на живі об'єкти.

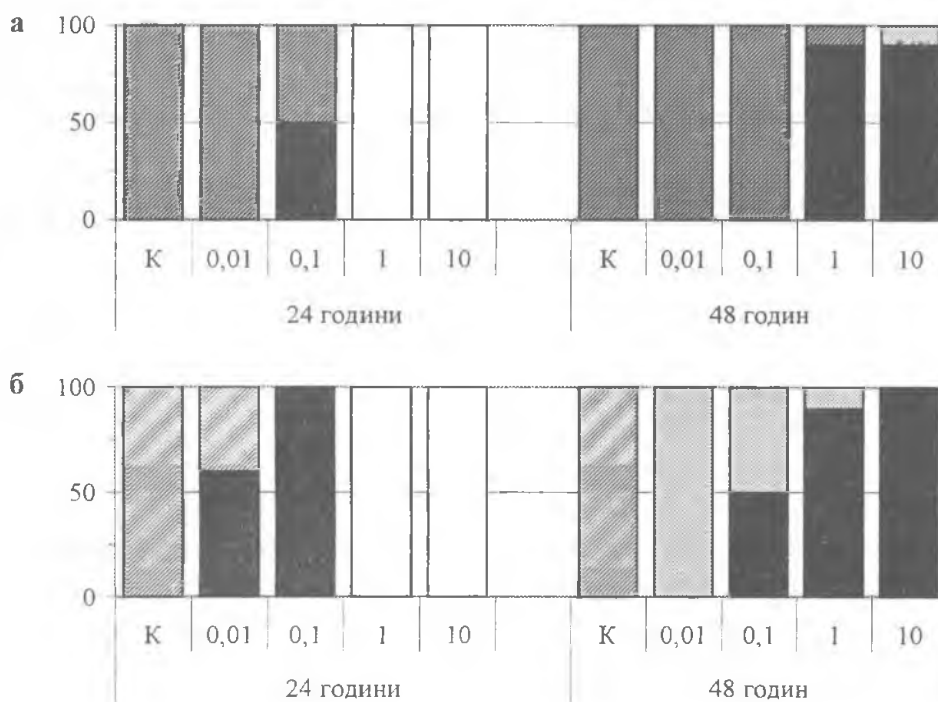


Рис. 2. Залежність різних форм інактивації клітин *Candida albicans* від часу і концентрації цинкових комплексів мезо-тетракис(4-N-метілпіридил)порфірин йодиду (а) та тозилату (б)

Висновки

1. Клітини добової культури *Candida albicans* є чутливими до фотосенсибілізуючої дії досліджуваних синтетичних порфіринів.
 2. Найбільш ефективними фотосенсибілізаторами в порівнянні з вільними основами синтетичних порфіринів є їх цинкові комплекси.
 3. Використання методу мікроколоній дає можливість не тільки оцінити вплив досліджуваних сполук на дріжджові клітини, але і визначити характер цієї дії, зокрема, нямвність віддалених ефектів.
- Дослідження проведено у рамках проекту 4.05.1, що виконується за держзамовленням МОН України.

Література

1. Квасников Е. И., Щеклова И. Ф. Дрожжи. Биология. Пути использования. — Киев: Наукова думка, 1991. — С. 32–33.
2. Русакова М.Ю. Дрожжевые клетки как тест-система для определения активности новых синтетических фотосенсибилизаторов. Тези доповіді VI-ї конференції молодих онкологів України “Сучасні проблеми експериментальної та клінічної онкології”, 4-5 грудня 2003, м. Київ, с. 49.
3. Філіпова Т.О., Русакова М.Ю., Галкин Б.М. и др. Застосування дріжджів *Candida albicans* і *Rhodotorula bogoriensis* для вивчення фотосенсибілізуючих властивостей синтетичних порфіринів // Одеський медичний журнал. — 2003. — № 4. — С. 34–38.
4. Соколов В. В., Странаджко Е. Ф., Жаркова Н. Н. и др. Фотодинамическая терапия злокачественных опухолей основных локализаций с препаратами фотогем и фотосенс (результаты трёхлетних наблюдений) // Вопр. онкологии. — 1995. — Т. 41, № 1. — С. 134 — 138.
5. Страховская М. Г., Беленкина Н. С., Иванова Э. В. и др. Фотодинамическая инактивация дрожжей *Candida guilliermondii* в присутствии фотодитазина // Микробиол. — 2002. — Т. 71, № 3. — С. 349–353.
6. Ali H., van Lier J. E. Metal Complexes as Photo- and Radiosensitizers // Chem. Rev. — 1999. — V. 99, № 9. — P. 2379–2450.
7. Balls M., Karcher W. The validation of alternative test methods // ALTA. — 1995. — V. 23. — P. 884–886.
8. Hillesberg R. van, Kost W. J., Wilson J. H. P Current Status of Photodynamic Therapy in Oncology // Drugs. — 1994. — V. 48, № 4. — P. 510–524.

М. Ю. Русакова, Б. Н. Галкин, Т. О. Филиппова, З. И. Жилина,
Т. И. Захаркина, Г. М. Кириченко

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

ФОТОИНАКТИВАЦИЯ КЛЕТОК *CANDIDA ALBICANS* В ПРИСУТСТВИИ СИНТЕТИЧЕСКИХ ПОРФИРИНОВ

Резюме

Исследована активность синтетических фотосенсибилизаторов с помощью тест-системы на основе культуры *Candida albicans*, которая позволяет оценить не только уровень фотодинамического воздействия веществ, а также его форму. Среди изученных соединений наиболее активным являлся цинковый комплекс мезо-тетраakis(4-N-метилпиридил)порфирин тозилата. Данное производное вызывало задержку деления дрожжей на протяжении 24 часов и появление “цепочек” клеток на вторые сутки, что соответствует отдаленной инактивации.

Ключевые слова: фотосенсибилизатор, фотодинамическая активность, *Candida albicans*, порфирины, отсроченное действие.

**M. Yu. Rusakova, B. N. Galkin, T. O. Philippova, Z. I. Zhilina,
T. I. Zakharkina, G. M. Kirichenko**

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

**CANDIDA ALBICANS CELLS PHOTOINACTIVATION IN PRESENCE
OF SYNTHETIC PORPHYRINS**

Summary

One of most numerous photosensitizers among researched ones is a porphyrin derivative. The activity definition of such chemicals by means of test — system on the basis of *Candida albicans* culture allows to estimate not only photodynamic influence level, and also its form.

Key words: photosensitizers, photodynamic activity, *Candida albicans*, porphyrins, deferred action.