

УДК 547.979/7:579.61: 615.28

МОНОКАТИОННЫЙ ХЛОРИНОВЫЙ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОР ДЛЯ ЭФФЕКТИВНОЙ ФОТОИНАКТИВАЦИИ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ[§]

© 2023 г. А. В. Кустов^{1,*}, Н. В. Кукушкина¹, Е. В. Лялякина², Н. Н. Соломонова²,
А. К. Гагуа³, академик РАН О. И. Койфман^{1,4}, Д. Б. Березин⁴

Поступило 17.06.2022 г.

После доработки 23.11.2022 г.

Принято к публикации 25.11.2022 г.

Предложен водорастворимый монокатионный хлориновый фотосенсибилизатор для антимикробной фотодинамической терапии локализованных поверхностных инфекций. Исследована антимикробная активность хлорина и широко используемого в клинической противоопухолевой фотодинамической терапии фотосенсибилизатора “Фоторан e_6 ” в отношении планктонных форм нозокомиальных резистентных к антибиотикам грамотрицательных бактерий *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae* и *Acinetobacter baumannii*. Установлено, что оба фотосенсибилизатора обладают низкой темновой токсичностью, однако световая токсичность монокатионного хлорина на несколько порядков выше, и он может быть предложен в качестве нового агента для антимикробной фотодинамической терапии.

Ключевые слова: резистентные к антибиотикам штаммы микроорганизмов, антимикробная фотодинамическая терапия, монокатионный хлориновый фотосенсибилизатор

DOI: 10.31857/S2686953523700164, **EDN:** EWDYHW

ВВЕДЕНИЕ

Неуклонный рост резистентности патогенных микроорганизмов к антимикробным препаратам разных поколений является серьезным вызовом обществу, масштаб которого таков, что не может быть решен традиционными путями, связанными с получением новых антибиотиков, пул которых продолжает сужаться, в то время как число

мультирезистентных штаммов неумолимо растет [1–3]. Одним из альтернативных высокоэффективных способов борьбы с локализованными инфекциями является антимикробная фотодинамическая терапия (АФДТ) [3–8], которая представляет собой отличную от традиционной терапии антибиотиками стратегию лечения. АФДТ основана на селективном накоплении в микробных клетках окрашенных веществ, так называемых фотосенсибилизаторов (ФС), которые, будучи малотоксичными в темноте, при воздействии видимого света заданной длины волны и мощности, способны генерировать активные формы кислорода, что позволяет эффективно инактивировать патогенную микрофлору [3–5].

Введенные в клиническую практику или испытываемые в лабораториях для лечения опухолей незлектролитные и анионные ФС на основе порфиринов, хлоринов или фталоцианинов [9–11] способны инактивировать грамположительные микроорганизмы [3, 4, 8, 12], однако грамотрицательные бактерии, имеющие внешнюю липополисахаридную мембрану, обычно оказываются малочувствительными к терапевтическим дозам таких ФС [12, 13]. Использование поликатионных фотосенсибилизаторов или ФС, конъюгированных с катионными полимерами, или добавка к растворам ФС потенцирующих агентов позволяет

[§] Работа представлена в тематический выпуск “Медицинская химия”.

¹Федеральное государственное учреждение науки Институт химии растворов им. Г.А. Крестова Российской академии наук, 153045 Иваново, Россия

²Областное бюджетное учреждение здравоохранения “Ивановская областная клиническая больница”, 153040 Иваново, Россия

³Федеральное государственное бюджетное учреждение “Национальный медицинский исследовательский центр оториноларингологии Федерального медико-биологического агентства”, 123182 Москва, Россия

⁴Федеральное государственное бюджетное учреждение высшего образования Ивановский государственный химико-технологический университет, 153012 Иваново, Россия

*E-mail: kustov26@yandex.ru

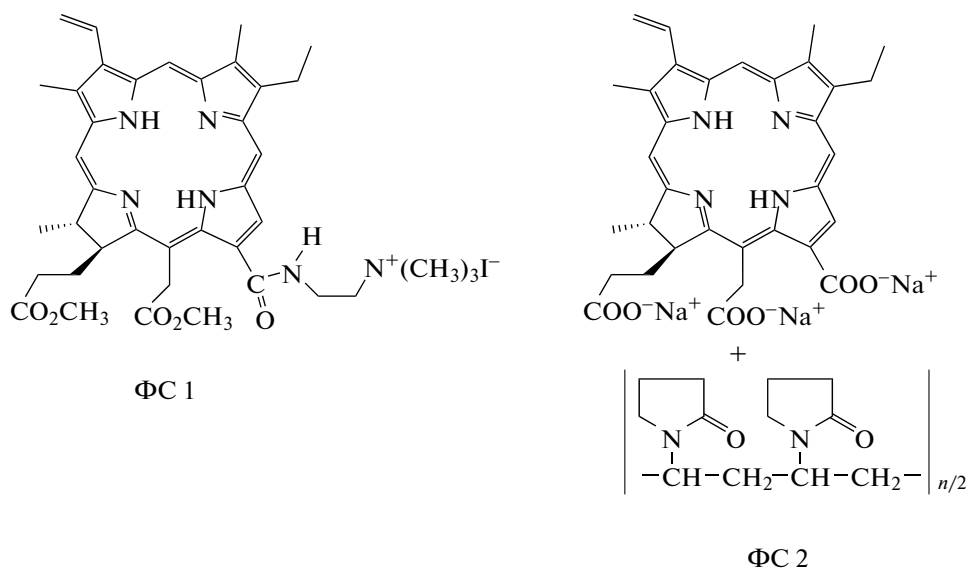


Рис. 1. Структурные формулы исследуемых ФС: 13(1)–(2'-триметиламмониеэтилиодид)амид-15(2),17(3)-диметил-овый эфир хлорина e_6 (ФС 1), тринатриевая соль хлорина e_6 в смеси с поливинилпирролидоном ("Фоторан e_6 ", ФС 2).

снизить число КОЕ Грам (–) патогенов в процессе АФДТ на несколько порядков (см. [4–6, 14, 15] и ссылки в этих работах), однако одновременно увеличивается темновая токсичность и существенно повышается стоимость препаратов.

В этой связи в настоящей работе представлены результаты исследования фотодинамической активности полусинтетического хлоринового ФС, содержащего одну катионную группу, в отношении трех нозокомиальных антибиотикорезистентных Грам (–) микроорганизмов группы ESKAPE [12]. Исследуемый ФС получается в 4 стадии из сине-зеленой водоросли *Spirulina platensis*, имеет высокую степень чистоты, растворим в водных средах, обнаруживает эффективную генерацию синглетного кислорода и, таким образом, может рассматриваться как новый перспективный агент для АФДТ.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Структуры молекул монокатионного хлорина, а также широко используемого в клинической практике ФС "Фоторан e_6 " представлены на рис. 1. Двухстадийный синтез ФС 1 из доступного метилфеофорбида *a*, его идентификация методами ^1H ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии, определение величины квантового выхода синглетного кислорода химическим и спектроскопическим методами, ассоциация и агрегация молекул ФС в водных растворах подробно рассмотрены ранее [16–18]. Используемые в работе реагенты: фотосенсибилизатор "Фоторан e_6 " (Ранфарма, Россия), ϵ -полилизин (число полимеризации ~30, Китай), Твин 80 (Panreac, Испания), эти-

лендиаминтетраацетат натрия ($\text{Na}_2\text{H}_2\text{Edta}$, Panreac) использовались без дополнительной очистки.

Фотоинаktivация патогенной микрофлоры проводилась с помощью светодиодной панели (БМЦ, Белоруссия), излучающей в диапазоне длин волн 580–720 нм с максимумом испускания при 660 нм [19]. Плотность светового излучения или энергетическая освещенность (доза излучения) определялась на основании показаний неселективного радиометра "Аргус 03" (ВНИИОФИ, Россия) и составляла 40 или 80 Дж см^{-2} .

Все бактериологические исследования с нозокомиальными условно-патогенными микроорганизмами проводились в сертифицированной клинико-диагностической лаборатории Ивановской областной клинической больницы. Суточные культуры штаммов микроорганизмов на среде Олькеницкого смывали стерильным физиологическим раствором и доводили до концентрации $\sim(2.4\text{--}2.7) \times 10^8$ КОЕ в 1 мл (0.8–0.9 ед. по стандарту МакФарланда). Посевную дозу 2×10^7 КОЕ в 1 мл готовили из исходной взвеси путем разведения. Методика проведения фотоинаktivации была в целом аналогичной, описанной ранее [6], с тем различием, что высеив на плотную питательную среду осуществлялся непосредственно после проведения эксперимента. Подсчет числа КОЕ проводился через 24 ч инкубации в термостате при 37°C. Полученные результаты представлены на рис. 2–4.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты исследования темновой и световой токсичности монокатионного хлорина и анион-

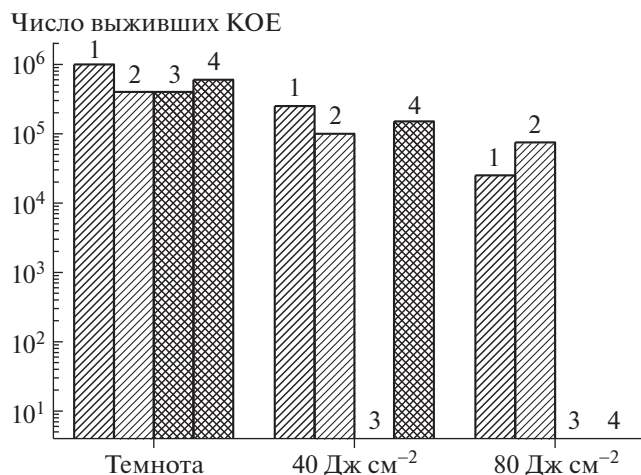


Рис. 2. Фотоинаktivация *Pseudomonas aeruginosa in vitro*: 1 – 100 мкмоль кг⁻¹ (ФС2); 2 – 100 мкмоль кг⁻¹ (ФС2) + 0.025 мас. % ε-полилизина; 3 – 100 мкмоль кг⁻¹ (ФС1), 4 – 100 мкмоль кг⁻¹ (ФС1) + 0.5 мас. % Твин 80. Световой контроль – 6×10^6 КОЕ. Патоген резистентен к препаратам “Меропенем”, “Ципрофлоксацин”, “Цефепим”, “Имипенем”, “Цефоперазон”, “Гентамицин”, чувствителен к “Полимиксину”.

ного фотосенсибилизатора “Фоторан е₆” в отношении нозокомиальной планктонной формы синегнойной палочки представлены на рис. 2. Как видно, оба ФС обладают низкой темновой токсичностью, и число КОЕ *Pseudomonas aeruginosa* практически не отличается от контроля. ФС 1 при облучении с дозой 40 Дж см⁻² позволяет полностью инаktivировать патоген, в то время как при добавке неионогенного поверхностно-активного вещества (ПАВ) Твин 80, образующего устойчивый комплекс с ФС, для полного подавления роста требуется 80 Дж см⁻².

Возможно, это связано со сложностями диффузии синглетного кислорода из мицеллярной матрицы в условиях избытка ПАВ, что требует более высоких доз световой энергии. Интересно отметить, что снижение концентрации ФС 1 в два раза не сказывается на эффективности фотоинаktivации патогена. В свою очередь, “Фоторан е₆” даже при добавке 0.025 мас. % ε-полилизина и дозе 80 Дж см⁻² не позволяет снизить начальное число КОЕ даже на два порядка.

При исследовании антимикробной активности в отношении *Enterobacter cloacae* (рис. 3) обнаруживаются в целом аналогичные тенденции: растворы обоих ФС имеют достаточно низкую темновую цитотоксичность, а при облучении красным светом ФС 1 позволяет полностью инаktivировать патоген уже при облучении с дозой 40 Дж см⁻². Как видно из полученных данных, концентрация раствора ФС 1, по сравнению с синегнойной палочкой, может быть снижена в че-

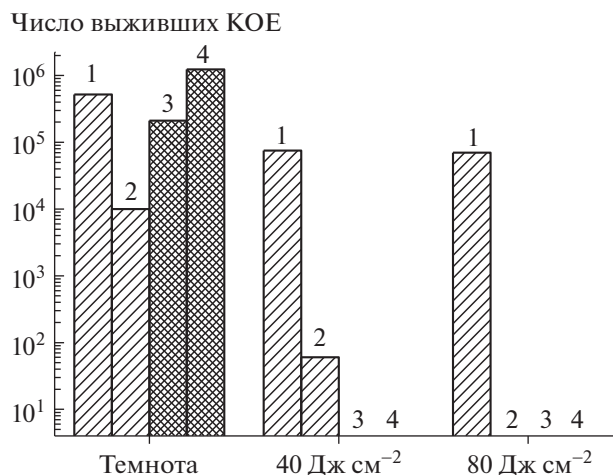


Рис. 3. Фотоинаktivация *Enterobacter cloacae*: 1 – 50 мкмоль кг⁻¹ (ФС2), 2 – 50 мкмоль кг⁻¹ (ФС2) + 0.1 мас. % ε-полилизина, 3 – 25 мкмоль кг⁻¹ (ФС1), 4 – 50 мкмоль кг⁻¹ (ФС1). Световой контроль – 2×10^6 КОЕ. Патоген резистентен к препаратам “Фурадонин”, “Ципрофлоксацин”, “Цефтриаксон”, “Ампициллин”, “Цефотаким”, “Налидиксовая кислота”, чувствителен к “Гентамицина сульфату”.

тыре раза без потери эффективности фотоинаktivации.

Фотоинаktivация с ФС 2 независимо от величины энергетической освещенности снижает число КОЕ лишь на порядок. Добавка к раствору “Фоторан е₆” 0.1 мас. % ε-полилизина позволяет при дозе облучения 80 Дж см⁻² полностью инаktivировать патоген.

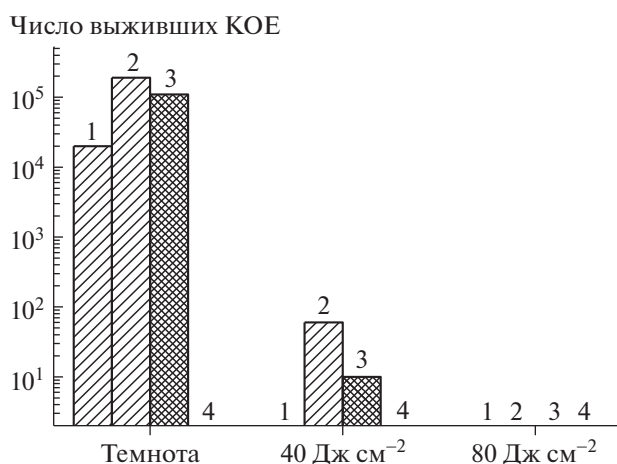


Рис. 4. Фотоинаktivация *Acinetobacter baumannii*: 1 – 100 мкмоль кг⁻¹ (ФС2) + 0.1 мас. % Na₂H₂Edta; 2 – 100 мкмоль кг⁻¹ (ФС2) + 0.1 мас. % ε-полилизина; 3 – 50 мкмоль кг⁻¹ (ФС1); 4 – 50 мкмоль кг⁻¹ (ФС1) + 0.1 мас. % Na₂H₂Edta. Световой контроль – 2×10^6 КОЕ. Патоген резистентен к препаратам “Меропенем”, “Ципрофлоксацин”, “Цефепим”, “Имипенем”, “Гентамицин”, “Цефтазидим”, “Цефоперазон”, чувствителен к “Полимиксину”.

тивировать патогенную микрофлору, однако наблюдаемое повышение эффективности в значительной степени является следствием усиления темновой токсичности (см. рис. 3), вызванной добавкой катионного полимера, который имеет высокую аффинность к внешней мембране Грам (–) бактерий [4, 19].

На рис. 4 представлены результаты фотоинактивации еще одного антибиотикорезистентного патогена из группы ESKAPE [12], поиск альтернативных путей инактивации которого имеет большое значение [3, 12]. Как видно, растворы обоих ФС обнаруживают ощутимую темновую цитотоксичность, при этом добавка 0.1 мас. % $\text{Na}_2\text{H}_2\text{Edta}$ к раствору ФС 1 приводит к полной гибели патогена через 40 мин инкубации в темноте, в то время как в растворе ФС 2 она снижает число КОЕ лишь на два порядка. Поскольку этилендиаминтетраацетат натрия дестабилизирует внешнюю мембрану и ускоряет проникновение молекул ФС внутрь грамотрицательных бактерий [19, 20], разумно заключить, что в присутствии $\text{Na}_2\text{H}_2\text{Edta}$ катионный ФС 1 проникает внутрь микробной клетки, что приводит к более выраженной цитотоксичности. Облучение красным светом позволяет полностью инактивировать патоген, при этом световой дозы уже в 40 Дж см^{-2} оказывается вполне достаточно, чтобы понизить число КОЕ на 5–6 порядков.

ВЫВОДЫ

Результаты проведенных исследований показывают, что монокатионный хлорин обладает выраженной фотодинамической активностью в отношении планктонных форм нозокомиальных антибиотикорезистентных грамотрицательных бактерий, которая значительно выше, чем у анионных ФС на основе хлорина e_6 . Оптимальными условиями для эффективной фотоинактивации Грам (–) патогенов можно считать концентрацию ФС – 50 μM и дозу светового излучения – 80 Дж см^{-2} , которая сообщается за 15 мин облучения. Предварительные оценки показывают, что эти же параметры могут быть использованы для фотоинактивации смешанной микрофлоры, в том числе и находящейся в состоянии биопленки. Установлено, что добавка нетоксичных в темноте для грамотрицательных бактерий небольших количеств ϵ -полилизина или $\text{Na}_2\text{H}_2\text{Edta}$ (0.05–0.1 мас. %), повышающих сродство молекул ФС к внешней липополисахаридной мембране, усиливает антимикробное действие ФС.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 21-13-00398, <https://rscf.ru/project/21-13-00398/>).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Wainwright M., Maisch T., Nonell S., Plaetzer K., Almeida A., Tegos G.P., Hamblin M.R.* // *Lancet Infect. Dis.* 2017. V. 17. № 2. P. e49–e55. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)30268-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)30268-7)
2. *Banin E., Hughes D., Kuipers O.P.* // *FEMS Microbiol. Rev.* 2017. V. 41. № 3. P. 450–452. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux016>
3. *Cieplik F., Deng D., Crieleard W., Buchalla W., Hellwig E., Al-Ahmad A., Maisch T.* // *Critical Rev. Microbiol.* 2018. V. 44. № 5. P. 571–589. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2018.1467876>
4. *Кустов А.В., Березин Д.Б., Стрельников А.И., Лапочкина Н.П.* Противоопухолевая и антимикробная фотодинамическая терапия: механизмы, мишени, клинико-лабораторные исследования: руководство. А.К. Гагуа (ред.). М.: Ларго, 2020. 108 с.
5. *Hamblin M.* // *Curr. Opin. Microbiol.* 2016. V. 33. P. 67–73. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.06.008>
6. *Kustov A.V., Kustova T.V., Belykh D.V., Khudyaeva I.S., Berezin D.B.* // *Dyes Pigm.* 2020. V. 173. P. 107948. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2019.107948>
7. *Fonseca A.S., Mencalha A.L., Paoli F.* // *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2021. V. 35. P. 102430. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2021.102430>
8. *Гейниц А.В., Толстых П.И., Дербенев В.А., Тамразова О.Б., Гусейнов А.И., Морозова Т.В., Гульмурадова Н.Т.* Фотодинамическая терапия гнойных и длительно не заживающих ран. Пособие для врачей. М.: МЗ РФ, 2004. 15 с.
9. *Van Straten D., Mashayekhi V., Bruijn H.S., Oliveira S., Robinson D.J.* // *Cancers.* 2017. V. 9. № 2. P. 1–54. <https://doi.org/10.3390/cancers9020019>
10. *Otvagin V.F., Kuzmina N.S., Krylova L.V., Volovitsky A.B., Nyuchev A.V., Gavryushin A.E., Meshkov I.N., Gorbunova Y.G., Romanenko Y.V., Koifman O.I., Balalaeva I.V., Fedorov A.Y.* // *J. Med. Chem.* 2019. V. 62. P. 11182. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b01294>
11. *Kustov A.V., Smirnova N.L., Privalov O.A., Moryganova T.M., Strelnikov A.I., Morshnev Ph.K., Koifman O.I., Lubimtsev A.V., Kustova T.V., Berezin D.B.* // *J. Clin. Med.* 2022. V. 11. № 1. P. 233. <https://doi.org/10.3390/jcm11010233>
12. *Yao L., Rong Q., Zaat S.A.J., Breukink E., Heger M.* // *J. Clin. Transl. Res.* 2015. V. 1. № 3. P. 140–167. <https://doi.org/10.18053/jctres.201503.002>
13. *Drulis-Kawa Z., Bednarkiewicz A., Bugla G., Strek W., Doroszkiwicz W.* // *Adv. Clin. Exp. Med.* 2006. V. 15. № 2. P. 279–283. <http://www.advances.umed.wroc.pl/en/article/2006/15/2/279>

14. Hamblin M.R. // Expert Review of Anti-infective Therapy. 2017. V. 15. № 11. P. 1059–1069. <https://doi.org/10.1080/14787210.2017.1397512>
15. Vieira C., Gomes A.T.P.C., Mesquita M.Q., Moura N.M.M., Neves M.G.P.M.S., Faustino M.A.F., Almeida A. // Front. Microbiol. 2018. V. 9. P. 2665. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02665>
16. Березин Д.Б., Солодучин Т.Н., Шухто О.В., Бельх Д.В., Старцева О.М., Худяева И.С., Кустов А.В. // Изв. АН. Сер. хим. 2018. Т. 67. № 7. С. 1273–1279.
17. Batov D.V., Kustov A.V., Kruchin S.O., Makarov V.V., Berezin D.B. // J. Struct. Chem. 2019. V. 60. № 3. P. 443–448. https://doi.org/10.26902/JSC_id39509
18. Kustov A.V., Morshnev Ph.K., Kukushkina N.V., Krestyaninov M.A., Smirnova N.L., Berezin D.B., Kokurina G.N., Belykh D.V. // C. R. Chimie. 2022. V. 97. № 1. P. 97–102. <https://doi.org/10.5802/crchim.158>
19. Huang L., Dai T., Hamblin M.R. Antimicrobial photodynamic inactivation and photodynamic therapy for infections. In: Photodynamic Therapy. Methods and Protocols. Gomer C.J. (Ed.). New York: Springer Dordrecht Heidelberg London. 2010. P. 155–174.
20. Gsponer N.S., Spesia M.B., Durantini N.E. // Photodiagn. Photodyn. Ther. 2015. V. 12. № 1. P. 67–75. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2014.12.004>

MONOCATIONIC CHLORIN PHOTSENSITIZER FOR EFFICIENT PHOTOINACTIVATION OF ANTIBIOTIC RESISTANT GRAM-NEGATIVE MICROORGANISMS

A. V. Kustov^{a,#}, N. V. Kukushkina^a, E. V. Lyalyakina^b, N. N. Solomonova^b, A. K. Gagua^c,
Academician of the RAS O. I. Koifman^{a,d}, and D. B. Berezin^d

^aG.A. Krestov Institute of Solution Chemistry, Russian Academy of Sciences (ISC RAS), 153045 Ivanovo, Russian Federation

^bIvanovo Regional Clinical Hospital, 153000 Ivanovo, Russian Federation

^cNational Medical Research Center for Otorhinolaryngology of the Federal Medico-Biological Agency of Russia, 123182 Moscow, Russian Federation

^dIvanovo State University of Chemistry and Technology, 153000 Ivanovo, Russian Federation

[#]E-mail: kustov26@yandex.ru

We propose a monocationic chlorin photosensitizer for antimicrobial photodynamic therapy of superficial localized infections. The antimicrobial activity of this specie towards planktonic forms of nosocomial antibiotic resistant pathogens, viz. *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae* u *Acinetobacter baumannii* was studied and compared with the activity of the well-established photosensitizer “Fotoran e₆”. Our results do indicate that monocationic chlorin provides efficient photoinactivation of all the three microorganisms and can be considered as a new agent for antimicrobial photodynamic therapy.

Keywords: antibiotic resistance microbial strains, antimicrobial photodynamic therapy, monocationic chlorin photosensitizer