

Т. О. Філіпова, М. Ю. Русакова, Б. М. Галкін, С. В. Водзинський

## ЗАСТОСУВАННЯ ДРІЖДЖІВ *CANDIDA ALBICANS* І *RHODOTORULA BOGORIENSIS* ДЛЯ ВИВЧЕННЯ ФОТОСЕНСИБІЛІЗУЮЧИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ СИНТЕТИЧНИХ ПОРФІРИНІВ

Одеський національний університет ім. І. І. Мечникова

Фотодинамічна терапія (ФДТ) вважається перспективним методом лікування злоякісних новоутворень і низки неонкологічних захворювань [1]. Важливим компонентом успіху при цьому підході є використання ефективних фотосенсибілізаторів. Препарати, що сьогодні застосовують у клініці (гематопорфірин, фотофрин II), є сумішшю кількох різних порфіринів [2]. Вони нестійкі, хімічний склад різних партій неоднаковий. Вищенаведене стимулювало пошук нових фотосенсибілізаторів серед синтетичних порфіринів та їх аналогів. Нині у світі синтезовано тисячі таких сполук. Це в свою чергу потребує створення експериментальних біологічних моделей, за допомогою яких можна було б проводити ефективний скринінг. Такі моделі мають бути недорогими та дозволяти швидко отримувати результати. Тому увагу дослідників все частіше привертають так звані клітинні моделі [3].

Метою нашої роботи було вивчення можливості використання двох видів дріжджів *Candida albicans* і *Rhodotorula bogoriensis*, що відрізняються за фізіологічними та біохімічними властивостями, для добору фотосенсибілізаторів серед нових порфіринів.

### Матеріали та методи дослідження

У роботі було використано диплоїдні штами дріжджів *Can-*

*didia albicans* Y-2501T і *Rhodotorula bogoriensis* Y-50, отримані з колекції культур мікроорганізмів кафедри мікробіології та вірусології ОНУ ім. І. І. Мечникова. Ці штами мікроорганізмів мають подібні структурні та фізіологічні характеристики, єдине суттєве розходження — наявність у останнього пігментів каротиноїдної природи [4]. Тест-культури зберігали на скошеному МПА в пробірках при температурі 5 °С.

Як фотосенсибілізатори в роботі були використані сполуки, синтезовані в ПНІЛ-5 ОНУ, що являють собою йодид солі як вільної основи 5,10,15,20-тетракіс(4-N-метилпіридил)порфірину (I), так і її комплексів з нікелем (II) і цинком (III).

Діапазон концентрацій досліджуваних речовин ( $1 \cdot 10^{-6}$  моль/л,  $1 \cdot 10^{-7}$  моль/л та  $1 \cdot 10^{-8}$  моль/л) було обрано згідно з даними літератури щодо вивчення фотосенсибілізуючої активності таких сполук [5]. Для кожного похідного експеримент повторювали двічі, кількість повторів у кожному ряді дорівнювала 4. За контроль було взято суспензію опромінених клітин мікроорганізмів, що не містила екзогенних фотосенсибілізаторів.

У експериментах використовували добові культури, вирощені на скошеному МПА в пробірках. Для вивчення фотоіндукованого впливу досліджуваних сполук готували середовище, описане раніше [6],

яке розливали в пробірки, після внесення відповідної кількості досліджуваних речовин стерилізували в автоклаві при 0,5 атм.

Робоча концентрація мікроорганізмів становила  $1 \cdot 10^6$  клітин/мл. Попередня інкубація тест-культур зі сполуками проводилась при 37 °С протягом 30 хв при постійному струшуванні. Активацію досліджуваних речовин здійснювали за допомогою лампи розжарювання денного світла потужністю 500 Вт. Інтенсивність опромінення становила 20 Вт/см<sup>2</sup> на рівні зразка.

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

Отримані результати обробляли методами варіаційної статистики з використанням t-критерію Стьюдента за допомогою програми Excel-2000.

### Результати дослідження та їх обговорення

Для дослідження чутливості дріжджових клітин різних видів до ФДТ було використано водорозчинний катіонний 5,10,15,20-тетракіс(4-N-метилпіридил)порфірин (I), який має найбільшу фотодинамічну активність серед катіонних мезозаміщених тетрапіролів [5]. Одночасно вивчали два його металокомплекси: з нікелем (II) та цинком (III). Усі сполуки були представлені у вигляді йодидів. За характером росту



контрольних та опромінених культур спостерігали протягом двох діб.

Отримані дані (рис. 1, 2) свідчать про те, що виражена затримка росту культур *C. albicans* і *R. bogoriensis* спостерігається при концентрації порфіринів, яка дорівнює  $1 \cdot 10^{-6}$  моль/л. Найменша концентрація або майже не впливає на інтенсивність поділу дріжджових клітин (через 24 год), або суттєво стимулює його (на другу добу). За здатністю підвищувати ріст дріжджів досліджені сполуки утворюють такий ряд:  $I \geq II \gg III$ , тобто більш виражений ефект виявляє вільна порфіринова основа, а найменший — її  $Zn^{2+}$ -вмісний комплекс (див. рис. 2). Більш чутливими до активуючої дії синтетичних мезозаміщених тетрапіролів є клітини *R. bogoriensis*. Під впливом сполуки I їх ріст збільшується у 1,9 разу, тимчасом як ріст *C. albicans* приблизно лише на 28 %.

Крім того, слід відмітити, що сполука III у цій концентрації трохи затримує ріст кандиди. Зіставляючи інгібуючу дію більшої концентрації досліджуваних сполук, можна зробити висновок про більш високу фотосенсибілізуючу активність металокомплексів. Затримка росту клітин *C. albicans* через 24 год після опромінення в присутності сполук I, II і III становить 15, 51 і 72 % відповідно (див. рис. 1). Для *C. albicans* ці показники ще більші: 8, 57 і 83 %. Слід наголосити, що порівняння ефектів Ni- та Zn-вмісних комплексів дає змогу зробити висновок про більш високу активність останнього. Застосування сполуки II спричинює максимум 2-3-кратну затримку росту тест-культур, тимчасом як у разі сполуки III цей показник вдвічі більше. Отримані результати збігаються з даними про активність цинкових комплексів тетрапіролів за умов ФДТ пухлин [7].

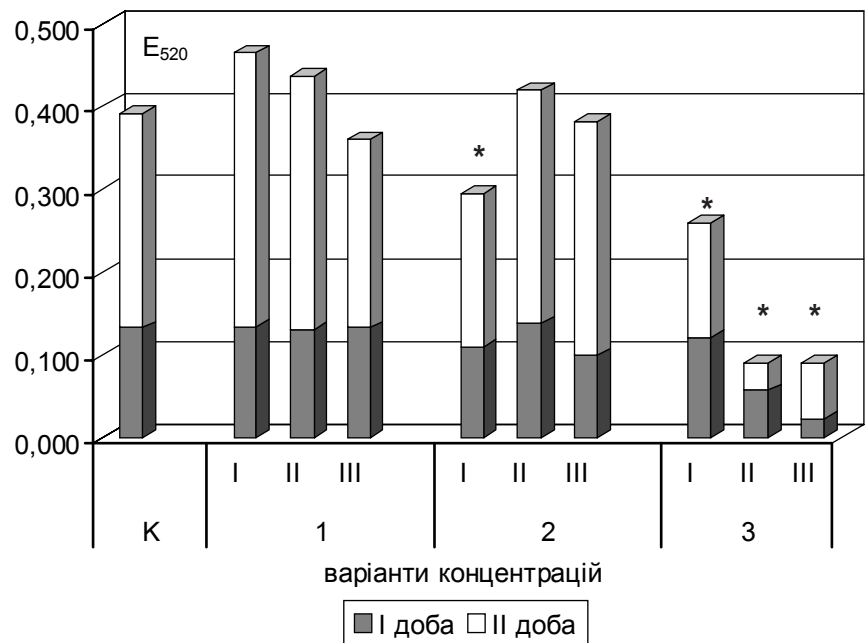


Рис. 1. Вплив 5,10,15,20-тетракіс(4-N-метилпіридил)порфірину (I) та його комплексів з нікелем (II) і цинком (III) на чутливість дріжджів *C. albicans* до дії опромінення: К — контроль, 1 —  $1 \cdot 10^{-8}$  моль/л, 2 —  $1 \cdot 10^{-7}$  моль/л; 3 —  $1 \cdot 10^{-6}$  моль/л; \* —  $P < 0,05$  порівняно з контролем

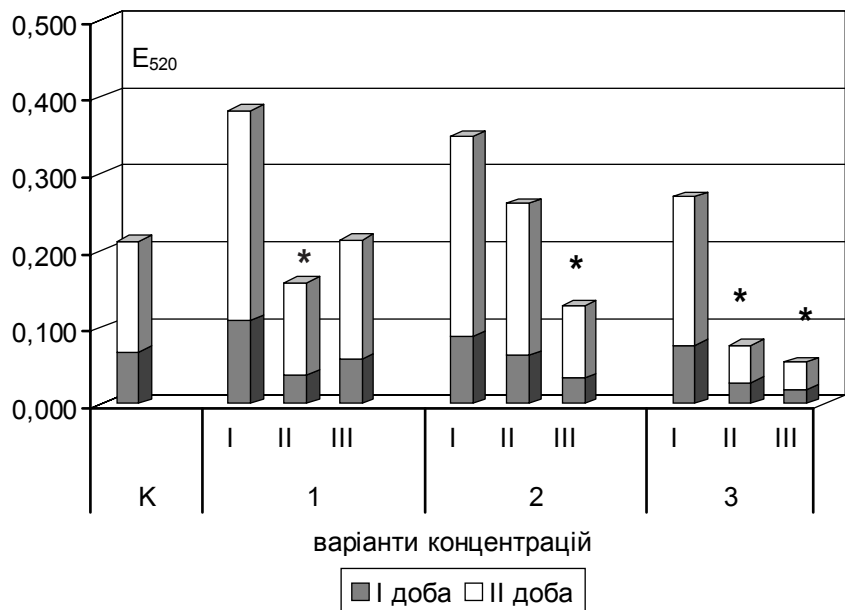


Рис. 2. Вплив 5,10,15,20-тетракіс(4-N-метилпіридил)порфірину (I) та його комплексів з нікелем (II) і цинком (III) на чутливість дріжджів *R. bogoriensis* до дії опромінення: К — контроль, 1 —  $1 \cdot 10^{-8}$  моль/л, 2 —  $1 \cdot 10^{-7}$  моль/л, 3 —  $1 \cdot 10^{-6}$  моль/л; \* —  $P < 0,05$  порівняно з контролем

Аналіз відповіді на фотодинамічний вплив дріжджових клітин двох видів свідчить про підвищену чутливість до дії фотосенсибілізаторів *C. albicans* порівняно з *R. bogoriensis*. На наш погляд, це може обумовлюватися двома причинами. По-перше, кандиди,

як показують наведені на рис. 1 та 2 дані, належить до більш інтенсивно проліферуючих клітин, а по-друге, цей вид дріжджів містить значну кількість флавінів [4], які сприяють фотоокисленню. Клітини *R. bogoriensis*, навпаки, характеризуються великим вмістом



Коефіцієнт інтенсивності росту культур протягом другої доби,  $M \pm m$ 

Вид дріжджів	Контроль	Досліджувані сполуки та їх концентрації, моль/л								
		I			II			III		
		$10^{-8}$	$10^{-7}$	$10^{-6}$	$10^{-8}$	$10^{-7}$	$10^{-6}$	$10^{-8}$	$10^{-7}$	$10^{-6}$
<i>C. albicans</i>	1,96±0,10	2,49±0,16	1,71±0,11	1,14±0,08	2,34±0,20	2,05±0,13	0,58±0,05	1,72±0,12	2,86±0,23	2,96±0,21
<i>R. bogoriensis</i>	2,09±0,14	2,52±0,16	3,16±0,26	2,63±0,17	2,92±0,19	3,14±0,21	2,76±0,20	2,55±0,22	1,66±0,11	1,89±0,13

каротиноїдів [4]. Останні, як відомо, захищають живі клітини від пошкодження активними радикалами кисню.

На користь використання мікроорганізмів як моделей для вивчення нових фотосенсибілізаторів свідчить також можливість швидкої оцінки характеру проліферації клітин у наступних поколіннях. У таблиці представлені коефіцієнти ( $k$ ), що відображають інтенсивність приросту біомаси на другу добу порівняно з першою. Отримані дані показують, що оптична густина контрольних культур через 48 год вдвічі перевершує рівень, що реєструється через 24 год. Зростання цього коефіцієнта при дії низьких концентрацій сполук до 2,5–3,0 на фоні абсолютного приросту підвищення кількості клітин є, на наш погляд, аналогом стимуляції росту пухлин неефективними дозами хіміотерапевтичних препаратів. Зниження інтенсивності росту ( $k \leq 2,0$ ) у віддалені терміни після опромінення свідчить про те, що порфіринові сенсibiliзатори не тільки спричиняють загибель клітин. Встановлено, що їх дія може проявитися лише у наступних поколіннях і бути виражена пригніченням інтенсивності поділу клітин. У клініці також показано, що деструкція пухлин після застосування

ФДТ є не миттєвим, а достатньо повільним процесом, її не можна пояснити лише дією активних радикалів кисню [8].

Нарешті, значне збільшення цього коефіцієнта на фоні суттєвого зменшення абсолютної кількості біомаси (найефективніші концентрації цинкового комплексу) вказує на присутність у популяції незначної кількості резистентних клітин, які набувають можливості для інтенсивного розмноження.

#### Висновки

Таким чином, одержані результати свідчать про доцільність застосування дріжджових культур для визначення активності нових фотосенсибілізаторів. Використання різних видів дріжджів, що відрізняються один від одного за фізіологічними та біохімічними параметрами, надає можливість одержати моделі швидко або повільно зростаючих новоутворень. Клітини *R. bogoriensis* можуть бути аналогом пухлин, що містять велику кількість антиоксидантів, наприклад меланом. Крім того, отримані результати обґрунтують використання фотосенсибілізуючої терапії у лікуванні кандидозів.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Миронов А. Ф. Фотодинамическая терапия рака // Успехи химии порфиринов. Т. 1; Под ред. проф.

О. А. Голубчикова. — СПб.: Изд-во НИИ химии СПбГУ, 1997. — С. 357-374.

2. Фотодинамическая терапия рака: второе и третье поколение фотосенсибилизаторов / Д. Верле, А. Гирт, Т. Богдан-Рай и др. // Изв. Академии наук. Серия химическая. — 1998. — № 5. — С. 836-845.

3. Ершов Ю. А., Плетнева Т. В., Слонская Т. К. Количественная оценка биологической активности токсических агентов (одноклеточные модели) // Бюл. exper. биологии и медицины. — 1997. — № 6. — С. 717-720.

4. Квасников Е. И., Щелокова И. Ф. Дрожжи. Биохимия. Пути использования. — К.: Наук. думка, 1991. — 328 с.

5. Водорастворимые тетрапиррольные фотосенсибилизаторы для фотодинамической терапии рака / А. В. Решетников, В. И. Швец, Г. В. Пономарев // Успехи химии порфиринов. Т. 2. — СПб.: Изд-во НИИ химии СПбГУ, 1999. — С. 70-89.

6. 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. — № 2. — С. 262-266.

7. Блознетте Л., Пономарев И. В. Эффективность фотодинамической терапии опухолей различной гистологической структуры // Рос. онколог. журнал. — 1997. — № 4. — С. 18-21.

8. Джагаров Б. М., Чирвоный В. С. Комплексы порфиринов с нуклеиновыми кислотами // Успехи химии порфиринов. — Т. 2. — СПб.: Изд-во НИИ химии СПбГУ, 1999. — С. 50-69.

