

Primena svetlosti u antimikrobnoj terapiji

Nemanja Zdravković¹, Radoslava Savić Radovanović²

1. Naučni institut za veterinarstvo Srbije, Beograd
2. Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine

Sažetak:

Priča o prevenciji i kontroli zaraznih bolesti ostaje otvorena jer se niz patogenih bakterija iznova pojavljuje kao izazivač infekcija. Da bi se taj problem prevazišao, antibiotici su bili dominantni tokom prethodne ere. Rezistencija kao fenomen kojim se patogenimikroorganizmi opiru dejstvu lekove je postavo izuzetno raširen u svetu. Više naučnih pravaca se razvija u svrhu prevazilaženja ovog problema, pa je tako fotodinamička inaktivacija definisana u platformu za otkrivanje i razvoj antimikrobnih sredstava. Koncept fotodinamičke inaktivacije je prilično jednostavan i zahteva izlaganje mikroba energijom svetla koja uzrokuje pobuđivanje molekula, što rezultira proizvodnjom singlet kiseonika ili drugim reaktivnim kiseoničkim vrstama koje reaguju sa intracelularnim komponentama, a posledično dovode do ćelijske inaktivacije. To je oblast sve većeg interesovanja, kao i istraživanja u smerovima: (1) da se identifikuju fotohemijski i fotofizički mehanizmi uključeni u inaktivaciju, (2) da razviju moćni i klinički kompatibilni fotosenzibilizatori, (3) da se razume kako na fotoinaktivaciju utiču ključni mikrobn fenotip elementi (rezistencija na više lekova i efluks, virulencija i determinante patogeneze, biofilmovi), (4) da se istraže nove platforme za isporuku inspirisane trenutnim trendovima u farmakologiji i nanotehnologijama i (5) za identifikaciju fotoinaktivacije primene izvan kliničkog okruženja kao što je životna sredina tj. dezinfekciona sredstva.

Ključne reči: bakterije, lečenje, antimikrobni efekat, hitozan

Antimikrobna rezistencija

Od početka upotrebe penicilina, a kasnijeg razvoja i sinteze drugih antibiotika, vakcina i antiseptika, pobeda nad bakterijama je više puta proglašavana. Do 1980-ih, farmaceutske kompanije su bile ubeđene da antibiotika već ima dovoljno i da nije isplativo finansirati nova istraživanja, bilo je vreme da se „zatvori knjiga o zaraznim bolestima“ i naglasak je prebačen na druge zdravstvene probleme kao što su rak, dijabetes i bolesti srca. Ekstenzivna, ali i neodgovarajuća upotreba antibiotika postepeno je dovela do razvoja antimikrobne rezistencije. Penicilin je prvi put pušten u široku upotrebu ranih 1940-ih, a do 1944. polovina svih kliničkih izolata stafilokoka iz rana bila otporna na ovaj proglašeni „čudotvorni lek“. Danas je „zarazna bolest“ drugi najvažniji ubica u svetu, broj tri u razvijenim zemljama, a četvrti u SAD . uglavnom u starijoj i oslabljenoj populaciji. Širom sveta, 17 miliona ljudi umiru svake godine od bakterijskih infekcija. Pet klasa patogena otpornih na antibiotike pojavljuju se kao glavne pretnje po javno zdravlje: *Staphylococcus aureus* otporan na meticilin (MRSA), *Enterococcus faecalis* otporan na vankomicin (VRE), mikobakterije (Tuberkuloza) otporne na više lekova, Gram-negativne patogene i gljivice.

Fotodinamička terapija (FT) kao antimikrobni pristup

Kako se efikasnost antibiotika smanjuje i bliži kraj „ere antibiotika“, veliki međunarodni istraživački napori da se otkrivaju nove načine za iskorenjivanje bakterija. Naglasak je sada na tome kako shvatiti, sprečiti i ako je moguće eliminirati rezistenciju na više lekova zajedno sa istraživanjem novih načina za ubijanje mikrobnih patogena. Fotodinamsku terapiju (FT) zasnovanu na svetlosti slučajno su je otkrili Oskar Raab i Hermann von Tappiener pre više od 100 godina kada su primetili da su jednoćeliski organizmi *Paramecium* spp. obojeni akridin narandžastim inaktivisani nakon izlaganja svetlosti. Sedamdesetih godina prošlog veka, FT se mahom istraživala za selektivno uništavanje raka. Kasnije se javlja otkriće i alternativu za lečenje lokalizovanih infekcija. Princip FT uključuje upotrebu bezopasne vidljive svetlosti u kombinaciji sa supstratom osetljivom na svetlost — fotosenzibilizatorom (FS) — i efektorom što je najčešće kiseonik prisutan u i oko ćelija.

Diretno delovanje svetla na mikrobiološke agense

U opštoj podeli svetla kao elektromagnetnog zračenja prema talasnim dužinama poznat kao „svetlosni“ opsezi od UVC (200–280 nm), UVB (280–320 nm), UVA (320–400 nm), vidljivi (400–750 nm), bliski infracrveni (NIR, 750–1.200 nm) i srednji/daleki IR (1.200–10.000 nm). Sve ove različite talasne dužine su opisane karakteristikom smanjenja broja raznih vrsta mikroba ali su bakterije su najčešće proučavane slede, gljive, virusi, a paraziti tek sporadično. Pristupi zasnovani na svetlosti moraju povući ravnotežu između: (a) kvantni prinos mikrobne inaktivacije, drugim rečima koliko da li su fotoni potrebni da bi se ubio ili deaktivirao jedan mikrob; (b) dubina prodiranja svetlosti u tkivo ili u organsku materiju u svrhu dezinfekcije površina i (c) sklonost svetlosti da ošteti domaćina ćelije i tkiva.

Iz navedene grupacije se izdvaja opseg UVC koji je veoma aktivan sa smrtonosnom dozom od nekoliko mega džula energije da inaktivira veći broj patoloških agenata, ali ima slab prodor u tkivo i veliku mogućnost za da neželjeno oštetiti ćelije čoveka. Smatra se da su najbezbedniji UVC zraci na 220 nm. Plava svetlost ima umerenu aktivnost koja zahteva 100 J energije, a takođe ima relativno slabu penetraciju, sa manjim potencijalom neželjenog dejstva. Crveno svetlo ima slabu aktivnost osim ako nije se kombinuje sa fotosenzibilizujućom bojom (PS) što je već indirektno delovanje, a tada se aktivnost dramatično povećava.

Jedna od glavnih prednosti pristupa zasnovanih na svetlosti je to većina njih (ali ne svi) su po prirodi širokog spektra i mogu efikasno da unište razne patogene uključujući bakterije (Gram-pozitivne, Gram-negativne, mikobakterije), gljive (kvasnice i filamentne gljivice), viruse (DNK i RNK) i parazite. Štaviše, sa mogućim izuzetkom UVC, pokazalo se nemogućim da se veštački proizvedu otporne bakterije.

Indirektno delovanje

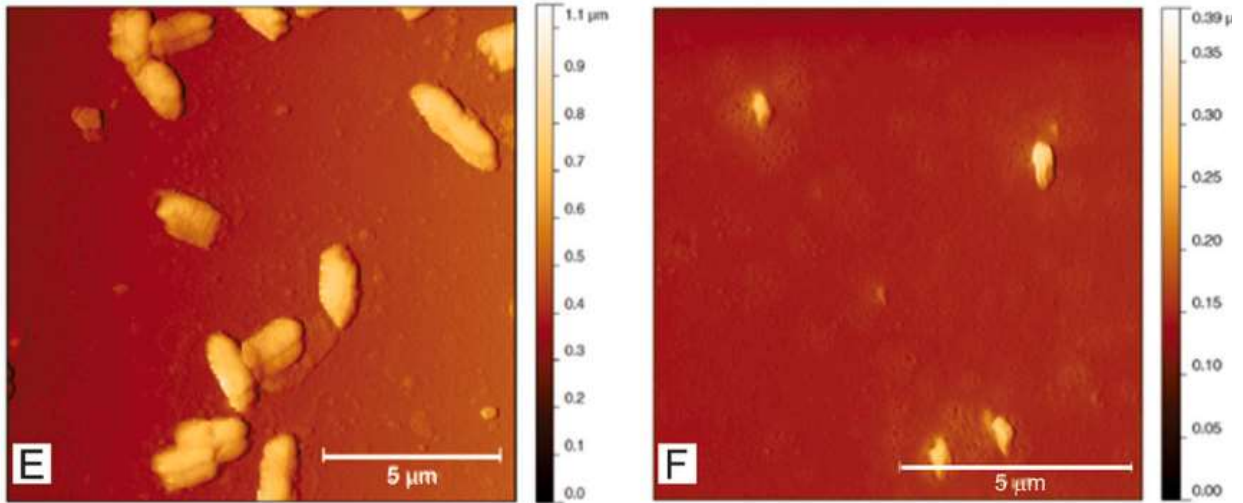
Kada se aktivacija fotosenzibilizujuće materije postiže pod delovanjem svetla govori se o indirektnom delovanju. Kako je prvenstveno izučavan ovaj efekat na brzodelećim ćelijama u cilju terapija tumora, za naučno izučavanje u svrhu terapije i/ili prevencije infekcija može se reći da kasni, a prvi radovi na objašnjenju mehanizma delovanja izlažu jedan nespecifičan put uništenja ćelija podjednako toksičan kako za prokariotske ćelije bakterija, tako i za eukariotske ćelije viših organizama – singletni kiseonik i ROS. Potpuna slika delovanja postaje jasnija objašnjenjem

transformacije kiseonika u singletni kisonik $^1\text{O}_2$ usled fotodinamičke reakcije porfirina pri obasjavanju svetlom. Od ranije je poznata aktivnost singletnog kiseonika kao vrlo reaktivnog oksigenacionog sredstva koje deluje na masti, lipide, proteine i nukleinske kiseline koji dovode do smrti ćelije. Kako je i sam kratko živeći, oštećenja produkuje samo u neposrednoj blizini formiranja. Singletni kiseonik može i da u istom smislu aktivira druge molekule označene dovede do stvaranja reaktivnih kiseoničkih grupa (ROS - hidroksidni radikali, vodonik peroksid, superoskidni anjon, itd..) koje imaju isti efekat, ali su dalekosežniji, odnosno započinju kaskadu lančanih reakcija oksigenacija. Od tog efekta ćelija se u prirodnim okolnostima brani antioksidacionim sredstvima (vitamin C, koenzim Q10, jedinjenja cinka, itd.). Ukoliko se terapijskom primenom unesu jedinjenja koja stvore dovoljno ROS tako da ćelija ne može da se odbrani dolazi do ciljanog efekta inaktivacije.

U teoriji FT je visoko selektivan modalitet pošto (1) hiperproliferirajuće ćelije selektivno preuzimaju FS i (2) ćelijska smrt je prostorno ograničena isključivo na regione gde se primenjuje svetlost odgovarajuće talasne dužine. Kako bakterijske ćelije poseduju veoma brze stope rasta, slično kao maligne ćelije, došlo se na ideju da se FT može koristiti za uništavanje mikroba — ovo je postalo stvarnost sredinom 1990-ih. Od tada, antimikrobna fotodinamička inaktivacija i terapija razvijeni su kao plodna platforma za otkrivanje i razvoj, istražujući mnoge aspekte bakterijske funkcije koji se odnose na rezistenciju na više lekova, kao što su sistemi efluksa antibiotika, biofilmovi, bakterijske spore i faktori virulencije. Ovaj trend, vremenom je prepoznat pretkliničkim i kliničkim antimikrobnim FT protokolima.

Naša iskustva

Sadašnja istraživanja idu ka dobijanju materijala koji pokazuju interesantne osobine pri izlaganju svelu. Svi ti materijali su zapravo polimerna jedinjenja bazirana na organskim, prirodnim molekulima koji su birani da budu inertni prema tkivu, a da se u ta fina tkanja polimera utisnu FS strukture. Inženjerskom modifikacijom se dalje može postići adaptirana dinamika otpuštanja aktivne supstance u sredinu u formi nanomaterijala i da se tek onda aktivira dejstvom svetla. Jedan od materijala koji pokazuje takve osobine je na bazi hitozana. Sam hitozan je inertan polisaharid dobijen iz oklopa mekušaca, jestiv i netoksičan, ali obradom i kontrolisanom polimerizacijom dobija i antioksidativna i antimikrobna sredsstva koja ga čine veoma dobrim kandidatom za izradu sredstva za previjanje rana.



Elektromikrofotografija bakterije *Klebsiella pneumoniae* izložne fotoaktivnoj materiji na bazi hitozana pre i nakon delovanja.

Preuzeto iz Zmejkoski i sar.,2021.

Literatura

1. Sigerist H. The Great Doctors. New York: Dover Publications 1971; 371.
2. Livermore DM. Antibiotic resistance in staphylococci. *Int J Antimicrob Agents* 2000; 16:3-10; PMID:11137402; [http://dx.doi.org/10.1016/S0924-8579\(00\)00299-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0924-8579(00)00299-5).
3. Kraus CN. Low hanging fruit in infectious disease drug development. *Curr Opin Microbiol* 2008; 11:434-8; PMID:18822387; <http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2008.09.009>.
4. Vicente M, Hodgson J, Massidda O, Tonjum T, Henriques-Normark B, Ron EZ. The fallacies of hope: will we discover new antibiotics to combat pathogenic bacteria in time? *FEMS Microbiol Rev* 2006; 30:841-52; PMID:17064283; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6976.2006.00038.x>.
5. Butler MS, Buss AD. Natural products—the future scaffolds for novel antibiotics? *Biochem Pharmacol* 2006; 71:919-29; PMID:16289393; <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2005.10.012>.
6. Raab O. Ueber die Wirkung fluoreszierender Stoffe auf Infusori. *Z Biol* 1900; 39:524-36.
7. Mitton D, Ackroyd R. A brief overview of photodynamic therapy in Europe. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2008; 5:103-11; PMID:19356640; <http://dx.doi.org/10.1016/j.pdpdt.2008.04.004>.
8. Dolmans DE, Fukumura D, Jain RK. Photodynamic therapy for cancer. *Nat Rev Cancer* 2003; 3:380-7; PMID:12724736; <http://dx.doi.org/10.1038/nrc1071>.
9. Foote CS. Definition of type I and type II photosensitized oxidation. *Photochem Photobiol* 1991; 54:659; PMID:1798741; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1751-097.1991.tb02071.x>.
10. Tanielian C, Mechin R, Seghrouchni R, Schweitzer C. Mechanistic and kinetic aspects of photosensitization in the presence of oxygen. *Photochem Photobiol* 2000; 71:12-9; PMID:10649884; [http://dx.doi.org/10.1562/0031-8655\(2000\)071<0012:MAKAOp>](http://dx.doi.org/10.1562/0031-8655(2000)071<0012:MAKAOp>)
11. Ochsner M. Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours. *J Photochem Photobiol B* 1997; 39:1-18; PMID:9210318; [http://dx.doi.org/10.1016/S1011-1344\(96\)07428-3](http://dx.doi.org/10.1016/S1011-1344(96)07428-3).
12. Valko M, Morris H, Cronin MT. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem* 2005; 12:1161-208; PMID:15892631; <http://dx.doi.org/10.2174/0929867053764635>.
13. Buettner GR. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alpha-tocopherol and ascorbate. *Arch Biochem Biophys* 1993; 300:535-43; PMID:8434935; <http://dx.doi.org/10.1006/abbi.1993.1074>.
14. Singleton DA, Hang C, Szymanski MJ, Meyer MP, Leach AG, Kuwata KT, et al. Mechanism of ene reactions of singlet oxygen. A two-step no-intermediate mechanism. *J Am Chem Soc* 2003; 125:1319-28; PMID:12553834; <http://dx.doi.org/10.1021/ja027225p.2>
15. Leach AG, Houk KN. Diels-Alder and ene reactions of singlet oxygen, nitroso compounds and triazolinediones: transition states and mechanisms from contemporary theory. *Chem Commun (Camb)* 2002; 1243-55; PMID:12109102; <http://dx.doi.org/10.1039/b111251c>.
16. Wainwright M, Byrne MN, Gattrell MA. Phenothiazinium-based photobactericidal materials. *J Photochem Photobiol B* 2006; 84:227-30; PMID:16713280; <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2006.03.002>.
24. Takahashi PK, Toups HJ, Greenberg DB, Dimopoulos GT, Rusoff LL. Irradiation of *Escherichia coli* in the visible

spectrum with a tunable organic-dye laser energy source. *Appl Microbiol* 1975; 29:63-7; PMID:1089163.

17. Huang L, Huang YY, Mroz P, Tegos GP, Zhiyentayev T, Sharma SK, et al. Stable synthetic cationic bacteriochlorins as selective antimicrobial photosensitizers. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54:3834- 41; PMID:20625146; <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00125-10>.
18. Castano AP, Demidova TN, Hamblin MR. Mechanisms in photodynamic therapy: part one-photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagn Photodyn Ther* 2004; 1:279-93; [http:// dx.doi.org/10.1016/S1572-1000\(05\)00007-4](http://dx.doi.org/10.1016/S1572-1000(05)00007-4).
19. Schäfer M, Schmitz C, Facius R, Horneck G, Milow B, Funken KH, et al. Systematic study of parameters influencing the action of Rose Bengal with visible light on bacterial cells: comparison between the biological effect and singlet-oxygen production. *Photochem Photobiol* 2000; 71:514-23; PMID:10818781; [http:// dx.doi.org/10.1562/0031-8655\(2000\)071<0514:SSO PIT>2.0.CO;2](http://dx.doi.org/10.1562/0031-8655(2000)071<0514:SSO PIT>2.0.CO;2).
20. Kubin A, Wierrani F, Jindra RH, Loew HG, Grunberger W, Ebermann R, et al. Antagonistic effects of combination photosensitization by hypericin, mesotetrahydroxyphenylchlorin (mTHPC) and photofrin II on *Staphylococcus aureus*. *Drugs Exp Clin Res* 1999; 25:13-21; PMID:10337500
21. Can light-based approaches overcome antimicrobial resistance? *Drug Dev Res.* 2019 Feb;80(1):48-67. doi: [10.1002/ddr.21453](https://doi.org/10.1002/ddr.21453)
22. Danica Z. Zmejkoski, Zoran M. Marković, Milica D. Budimir, Nemanja M. Zdravković, Dijana D. Trišić, Nikol Bugárová, Martin Danko, Natalia O. Kozyrovska, Zdeno Špitalský, Angela Kleinová, Sanja B. Kuzman, Vladimir B. Pavlović, Biljana M. Todorović Marković. Photoactive and antioxidant nanochitosan dots/biocellulose hydrogels for wound healing treatment. *Materials Science and Engineering: C* **2021**, *122*, 111925. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2021.111925>