

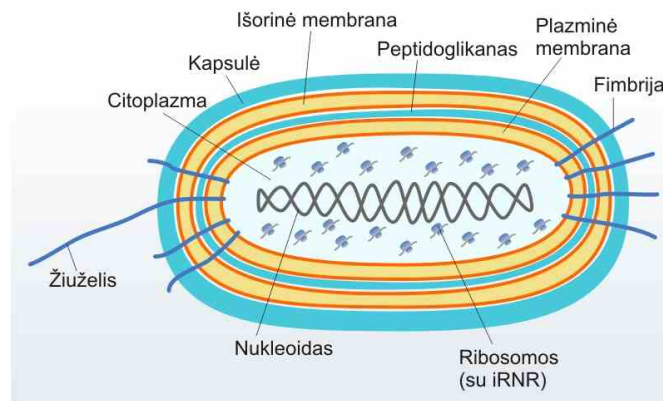
FOTOSENSIBILIZUOTA ANTIMIKROBINĖ TERAPIJA

Aptariami mikroorganizmų fotosensibilizacijos molekuliniai vyksmai ir jų taikymas antimikrobiniam gydymui

Mikroorganizmai, arba mikrobai, – tai gyvos būtybės, tokios mažos, kad yra nematomos plika akimi. Jas galima pamatyti tik pro mikroskopą. Paprastai tai būna vienaląščiai organizmai, tiesiog viena ląstelė. Mikroorganizmai – tai mikroskopiniai grybai (pavyzdžiui, mielės), mikroskopiniai protistai (vienaląščiai organizmai, turintys tikrąjį branduolį, t. y. jų DNR yra apgaubta branduolio apvalkalu; protistų būna gana didelių), bakterijos, archėjos (į bakterijas panašūs vienaląščiai organizmai, kaip ir bakterijos neturintys tikrojo branduolio, tačiau iš esmės besiskiriantys nuo bakterijų). Dėl kai kurių mikroorganizmų žmonės patiria daug žalos. Žalingi mikrobai naikinami jonizuojančiąja spinduliuote, aukšta temperatūra (pasterizacija) arba chemikalais. Atradus antibiotikus, visos viltys apsaugoti nuo žalingų mikroorganizmų kuri laiką buvo siejamos su naujų antibiotikų paieška ir sinteze. Tačiau kai atsirado bakterijų, atsparių daugeliui antibiotikų, imta kurti naujus mikrobuų naikinimo būdus. Vienas iš jų – mikroorganizmų fotosensibilizacija ir po to švitinimas. Kai šis būdas taikomas mikrobuų sukeliams ligoms gydyti, jis vadinamas fotosensibilizuota antimikrobine chemoterapija. Fotosensibilizaciją galima taikyti ne tik kaip terapijos būdą, bet ir kaip priemonę, apsaugančią maisto produktus nuo žalingų mikroorganizmų.

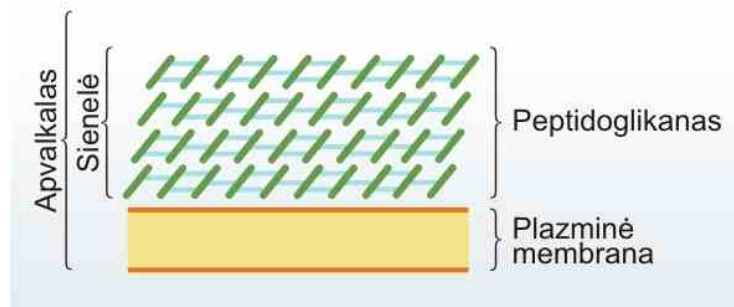
Navikų fotosensibilizacijai ir mikrobuų fotosensibilizacijai naudojami ne tie patys cheminiai junginiai. Kodėl? Kad fotosensibilizatorius galėtų gaminti ROS, kurie sunaikina ląstelę, pirmiausia jis turi patekti į pačią ląstelę arba bent prikibti prie jos išorinio sluoksnio. Gyvūnų, tarp jų ir žmogaus, ląstelių išorinis sluoksnis, skiriantis ląstelės vidų nuo išorės, labai skiriasi nuo bakterijų, archėjų ir grybų išorinio sluoksnio. Net bakterijos turi nevienodą apvalkalą. Pagal jo sandarą bakterijos skirstomos į dvi dideles grupes: gramteigiamas ir gramneigiamas bakterijas. XIX a. pabaigoje danų mokslininkas H. C. Gramas sukūrė dažymo būdą, kuris vienas bakterijas nudažo, o kitų – ne. Vėliau paaiškėjo, kad tai priklauso nuo bakterijų sienelės (apvalkalo dalis, esanti plazminės membranos išorėje). Nors šiuolaikinėse bakteriologijos laboratorijose

bakterijoms nustatyti naudojami molekulinės biologijos būdai, tačiau bakterijų skirstymas į gramteigiamas ir gramneigiamas (10.1 pav.) išlieka.



10.1 pav. Gramneigiamos bakterijos sandara

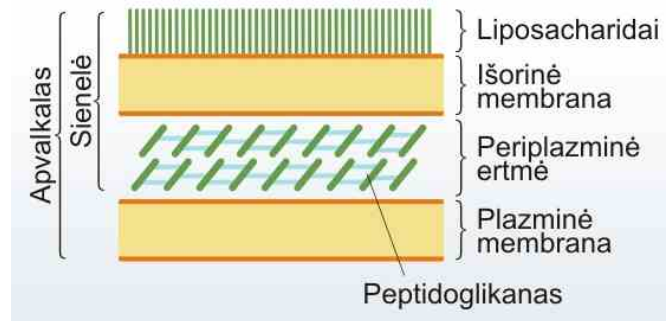
Gramteigiamų bakterijų sienelė, kurios storis yra 15–80 nm, sudaryta iš kelių dešimčių peptidoglikano sluoksnių (10.2 pav.). Gana stora sienelė praleidžia net dideles molekules, nes yra porėta.



10.2 pav. Gramteigiamos bakterijos apvalkalo sandara

Gramneigiamų bakterijų sienelė turi papildomą sluoksnį – 10–15 nm storio išorinę membraną (10.3 pav.), kurią nuo plazminės membranos skiria vadinamoji periplazminė ertmė. Išorinės membranos išorinėje dalyje tankiai išsidėsčiusios molekulių funkcinės grupės, fiziologinėmis sąlygomis turinčios neigiamą krūvį. Toks tankus darinys neįleidžia į ląstelę daugelio cheminių medžiagų. Infekciniai mikrobai taip saugosi nuo šeimininko organizmo gynybinių molekulių. Būtent kovai su gramneigiamomis bakterijomis ir norima panaudoti fotosensibilizaciją ir šviesą. Padėti fotosensibilizatoriams prasiskverbti

pro gramneigiamų bakterijų išorinę membraną gali katijoninis polipeptidas polimiksinas B arba cheminiai junginiai, kurie suriša Mg^{2+} ir Ca^{2+} jonus, neutralizuojančius paviršiaus neigiamus krūvius. Toks veiksmas sukelia elektrostatinį atostūmį ir destabilizuoja išorinės membranos struktūrą. Tada fotosensibilizatorius gali patekti į plazminę membraną.



10.3 pav. Gramneigiamos bakterijos apvalkalo sandara

Mielių, mikroskopinių grybų, apvalkalo išorinė sienelė, kurią nuo plazminės membranos skiria periplazminė ertmė, taip pat yra tanki. Tačiau ji fotosensibilizatorius praleidžia lengviau negu gramneigiamų bakterijų išorinė membrana.

Fotosensibilizatoriai antimikrobinei terapijai. Be patenkinamų fotofizikinių savybių, fotosensibilizatoriams, tinkamiems gydyti mikrobines infekcijas, būtina turėti ir kitų reikiamų savybių. Jie turi gebėti pasiekti bakterijų plazminę membraną ir į ją įsiterpti. Kadangi infekcijas dažnai sukelia ne vienos, o kelių klasių bakterijos, fotosensibilizatoriai turi veikti platų bakterijų spektrą. Be to, jie turi nesukelti bakterijų atsparumo fotosensibilizacijai ar fotosensibilizatoriams (Wainwright, 1998).

Anijoniniai fotosensibilizatoriai, turintys funkcinų grupių, kurios fiziologinėmis sąlygomis įgyja neigiamą krūvį, gali prasiskverbti tik pro gramteigiamų bakterijų sienelę. Gramneigiamų bakterijų fotosensibilizacija su anijoniniais dariniais neveikia. Tuo tarpu kai kurie fotosensibilizatoriai, kurių funkcinės grupės fiziologinėmis sąlygomis turi teigiamą krūvį, po švitinimo gali sukelti tiek gramteigiamų, tiek gramneigiamų bakterijų pažaidas. Tai fenotiazinų, ftalocianinų ir porfirinų dariniai. Fenotiazino dariniai, tokie kaip toluidino mėlis ir metileno mėlis, yra katijoniniai junginiai, nes jų konjuguotoje

sistemoje yra azoto atomas. Ftalocianinų ir porfirinų katijoniniai dariniai gaunami, į molekulę įterpus teigiamą krūvį turinčius pakaitus. Kuo ilgesnius hidrofobinius pakaitus turi fotosensibilizatoriai, tuo jie veiksmingesni (Reddi ir kt., 2002).

Spėjama, kad į gramneigiamas bakterijas katijoniniai fotosensibilizatoriai patenka aktyviuoju būdu – jie išstumia Mg^{2+} ir Ca^{2+} jonus iš jų surišimo vietų dėl daug didesnio giminingumo joms. Be to, didelės amfifilinės fotosensibilizatorių molekulės padidina membranos pralaidumą hidrofobinėms molekulėms, pavyzdžiui, kai kuriems antibiotikams. Atrodo, kad ilgi hidrofobiniai pakaitai įsiterpia į bakterijos sienelę ir pažeidžia jos trimatę struktūrą. Dėl to sienelė nebegali užtverti kelio molekulėms, kurių sveika membrana nepraleistų.

Kai kurios bakterijos, tokios kaip *Propionibacterium acnes*, jaunatvinių spuogų priežastis, bei garsioji *Helicobacter pylori*, skrandžio opos sukėlėja, geba gaminti porfirinus ir dėl to tampa jautrios regimai šviesai. Buvo pastebėta, kad šviesolaidžiu nukreipus mėlyną šviesą į skrandį, po švitinimo *H. pylori* kolonijų liko tik dešimtadalis (Nitzan, 1999). Didelius kiekius porfirinų (daugiausia protoporfirino IX) gamina kai kurios žmogaus burnoje gyvenančios bakterijos, sukeliančios dantenuų uždegimą. Tokias bakterijas galima paskatinti sintezuoti porfirinus, patepus paviršius, ant kurių gyvena tos bakterijos, porfirinų pirmtako 5-aminolevulino rūgšties (ALA) tepalu (Nitzan ir kt., 2004). Tad fotosensibilizacija galėtų veiksmingai sunaikinti tokių bakterijų kolonijas. Kadangi antibakterinei fotosensibilizacijai pakanka ne ilgesnės kaip 5 min. inkubacijos su fotosensibilizatoriumi, ji yra kur kas pranašesnė už antibiotikų naudojimą burnos infekcijoms gydyti, nes inkubuoti su išorinio poveikio antibiotiku reikia daug ilgiau, o burnoje tai padaryti nelengva.

Mikroorganizmų fotosensibilizacijos molekuliniai vyksmai. Svarbiausia ląstelės dalis, pažeidžiama švitinant fotosensibilizuotus mikrobus, yra plazminė membrana. Joje būna susitelkęs fotosensibilizatorius prieš švitinimą. Tik po švitinimo jis patenka į ląstelės vidų. Nustatyta, kad bakterijos plazminės membranos vidinėje pusėje išsidėstę fermentai, tokie kaip NADH dehidrogenazė ar laktato dehidrogenazė, praranda aktyvumą tokiu pačiu greičiu, kaip kad žūsta bakterijos. Išorinės membranos ir plazminės membranos baltymuose atsiranda sąsiuvų. Dėl membranų pažeidimų suyra kalio jonų pusiausvyra ir

sutrinka įvairių medžiagų įnašą į ląstelę. Ląstelei ima trūkti išteklių normaliai medžiagų apykaitai, dėl to bakterijos ima žūti. Žūvant fotosensibilizuotoms bakterijoms, į išorę išteka citoplazmoje esančios medžiagos (Jori ir kt., 2006).

Jau pačioje fotosensibilizuotų bakterijų švitinimo pradžioje dėl membranų pažeidimų į ląstelės vidų ima plūsti fotosensibilizatoriaus molekulės. Todėl vėlesnėse švitinimo stadijose fotooksiduojami ir gilesni citoplazmos sluoksniai. Kadangi bakterijų DNR neturi apvalkalo, skiriančio ją nuo citoplazmos, fotosensibilizatorius ir jo gaminami radikalai ar singuletinis deguonis ją lengvai pasiekia. Fotooksiduotos DNR pažeidos yra nustatytos ne vienos rūšies bakterijų ląstelėse, fotosensibilizuotose įvairiais katijoniniais junginiais: fenotiaziniais, ftalocianiniais ir porfiriniais. Dauguma duomenų rodo, kad DNR pažeidos nėra tiesioginė bakterijų žūties priežastis ir ląstelė žūva dėl plazminės membranos sudėtinių dalių fotooksidacijos.

Vienodomis fotosensibilizacijos ir švitinimo sąlygos negrįžtamai pažeisti grybų ląsteles yra daug sunkiau negu bakterijas. Grybų ląstelės yra daug didesnės ir norint sukelti tokias pažeidas, kurių ląstelė nebegalėtų kompensuoti, reikia daugiau laisvųjų radikalų ar singuletinio deguonies molekulių.

Fotosensibilizuotos antimikrobinės terapijos taikymas

Fotosensibilizacijos poveikis mikroorganizmams yra tyrinėtas daug mažiau negu jos poveikis žmogaus ir eksperimentinių gyvūnų ląstelėms. Tačiau galima apibrėžti bendrus fotosensibilizacijos režimo bruožus (10.1 lent.).

Svarbi fototerapijos ypatybė yra jos vietinis poveikis, t. y. ji veikia tik nedidelį plotą, ne visą organizmą. Todėl papildoma našta, tenkanti imuninei sistemai, yra nedidelė. Kol kas fotosensibilizuota antimikrobinė terapija nėra taikoma žmonėms gydyti, tačiau tyrimų su eksperimentiniais gyvūnais rezultatai yra puikūs.

10.1 lentelė. Fotosensibilizuotos antimikrobinės terapijos režimas (terapija), tinkamas sunaikinti (naudojama naikinti) Gramteigiamas ir Gramneigiamas bakterijas ir mieles (Jori ir kt., 2006).

<i>Rodiklis</i>	<i>Optimali reikšmė</i>
Fotosensibilizatorius	Katijoninis fenotiazinas, ftalocianinas arba porfirinas
Inkubacijos prieš švitinimą trukmė	5–10 min
Fotosensibilizatoriaus koncentracija	0,1–5 μM
Fotosensibilizatoriaus preparatas	Laisvas fotosensibilizatorius arba derinys su katijoniniais polipeptidais ar antikūnais; liposominis preparatas neveikia

Apšvita	Gramneigiamų bakterijų
Apšvieta	Ne didesnė kaip 50 mW/cm ²
	Ne didesnė kaip 5 J/cm ² (15 min)

Candida genties mielės kai kada sukelia nemalonią burnos infekciją – pienligę. Ypač dažnai ja serga žmonės, nusilpę dėl chemoterapijos ar radioterapijos, kurios mažina imunitetą. Eksperimentinė terapija, kai fotosensibilizacijai naudojamas fenotiazinų grupės junginys metileno mėlis, sunaikino visus mikrobus, nepakenkdama šiomis mielėmis užkrėstoms pelėms, kurių imuninė sistema buvo labai silpna (Teichert, 2002).

Fotosensibilizacija atrodo labai tinkama periodonto ligoms gydyti. Įvairių gramteigiamų ir gramneigiamų bakterijų mišinys dažnai sukelia chronišką dantenu uždegimą. Jos auga kaip bioplėvelė ir sudaro vadinamuosius dantų akmenis. Su infekcija kovojantys šeimininko neutrofilai išskiria metaloproteinazes, kurios kartu su bakterijų fermentais ardo audinį, gaubiantį dantis. Laikui bėgant, audinys „tirpsta“ ir dantys iškrenta. Tai dažna pagyvenusių žmonių nelaimė. Kai kuriuos mikrobus, sukeliančius periodonto ligas, veiksmingai naikina fotosensibilizuota terapija su toluidino mėliu (Komerik ir kt., 2003). Fotosensibilizatoriaus tepalo įterpiama į danties kišenę ir į ten šviesolaidžiu nukreipiama šviesa. Visa procedūra trunka tik kelias minutes.

Infekuotas žaizdas fotosensibilizacija ir švitinimas gydo dėl dviejų priežasčių. Pirma, fotosensibilizuota terapija sunaikina mikrobus, dėl kurių kai kurios žaizdos negyja mėnesius. Antra, mažos fotosensibilizuotos terapijos dozės skatina augimo veiksmų gamybą sveikose ląstelėse, supančiose žaizdą (Hamblin ir kt., 2002).

Vaistams atsparūs mikrobai labai plinta, ir fotosensibilizacija galėtų būti viena iš naujų alternatyvų gydyti ligas, kurias sukelia mikroorganizmai. Todėl mikroorganizmų fotosensibilizacijos tyrimai yra labai svarbūs ir labai perspektyvūs.