

# ИССЛЕДОВАНИЕ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРА ДЛЯ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ НА ОСНОВЕ ЦИКЛОДЕКСТРИНОВОЙ КОМПОЗИЦИИ МЕТИЛОВОГО ЭФИРА 13<sup>3</sup>-N-(N-МЕТИЛНИКОТИНИЛ) БАКТЕРИОПУРПУРИНИМИДА

Г.А. Меерович<sup>1,2</sup>, Е.В. Ахлюстина<sup>2</sup>, И.Г. Тиганова<sup>3</sup>, А.В. Панов<sup>4</sup>, В.С. Тюкова<sup>4</sup>,  
 Э.Р. Толордава<sup>3</sup>, Н.В. Алексеева<sup>3</sup>, К.Г. Линьков<sup>1</sup>, Ю.М. Романова<sup>3</sup>, М.А. Грин<sup>4</sup>,  
 А.Ф. Миронов<sup>4</sup>, В.Б. Лощенов<sup>1,2</sup>, А.Д. Каприн<sup>5</sup>, Е.В. Филоненко<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Институт общей физики им. А.М. Прохорова РАН, Москва, Россия

<sup>2</sup>Национальный исследовательский ядерный университет МИФИ, Москва, Россия

<sup>3</sup>Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного акад. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия

<sup>4</sup>Московский технологический университет МИРЭА, Москва, Россия

<sup>5</sup>Национальный медицинский исследовательский радиологический центр Минздрава России, Москва, Россия

## Резюме

Катионные бактериохлорины перспективны как антимикробные фотосенсибилизаторы для антибактериальной фотодинамической терапии. Настоящая работа посвящена изучению свойств нового наноструктурированного катионного фотосенсибилизатора на основе циклодекстриновой дисперсии производного бактериохлорина – метилового эфира 13<sup>3</sup>-N-(N-метилникотинил)бактериопурпуринымида (КБХ), с целью оптимизации состава дисперсии и выбора интервала времени от введения фотосенсибилизатора до проведения фотодинамической терапии инфицированных гнойных ран. Оценены особенности поглощения и флуоресценции фотосенсибилизатора в зависимости от его концентрации и соотношения между компонентами дисперсии. Изучена фармакокинетика и биораспределение фотосенсибилизатора в органах и тканях intactных мышей и гнойных ранах, инфицированных *P. aeruginosa* или *S. aureus*.

Предварительные исследования показали высокую эффективность антимикробной фотодинамической терапии инфицированных гнойных ран с циклодекстрированной дисперсией КБХ. Проведенные исследования поглощения и спектрально-флуоресцентных свойств его лекарственной формы в зависимости от ее состава позволили рекомендовать использование массового отношения КБХ : циклодекстрин около 1:200 и введение для уменьшения агрегации 0,1% Твин-80.

Установлено, что КБХ быстро выводится из кровотока мыши: более 70% – за 2 ч, 95% – за 1 сут, более 99% – за 6 сут. Из кожи и мышц около 98% выводится за 6 сут. Фотосенсибилизатор накапливается и удерживается до 24 ч в печени и почках. Это позволяет предположить, что элиминирование фотосенсибилизатора из организма мышей происходит через почки и печень. Обнаружено, что в тканях, в частности, в коже и мышцах, через 24 ч наблюдается частичная агрегация фотосенсибилизатора. Это позволяет предположить, что уменьшение интенсивности его флуоресценции через 24 и более часа связано не только с его элиминацией из организма, но и с агрегацией. Спектрально-флуоресцентное исследование показали, что КБХ селективно накапливается в инфицированных ранах, флуоресцентная контрастность лежит в пределах 3–4. Наиболее высокие значения концентрации и селективности его накопления в инфицированных ранах были достигнуты через 1,5–3 ч после внутривенного введения. Облучение через 2 ч после введения обеспечило высокую эффективность терапии инфицированных гнойных ран.

**Ключевые слова:** антимикробная фотодинамическая терапия, метиловый эфир 13<sup>3</sup>-N-(N-метилникотинил)бактериопурпуринымида, производные бактериохлорина, поглощение, флуоресценция, агрегация, циклодекстрин.

**Для цитирования:** Меерович Г.А., Ахлюстина Е.В., Тиганова И.Г., Панов А.В., Тюкова В.С., Толордава Э.Р., Алексеева Н.В., Линьков К.Г., Романова Ю.М., Грин М.А., Миронов А.Ф., Лощенов В.Б., Каприн А.Д., Филоненко Е.В. Исследование фотосенсибилизатора для антибактериальной фотодинамической терапии на основе циклодекстриновой композиции метилового эфира 13<sup>3</sup>-N-(N-метилникотинил)бактериопурпуринымида // Biomedical Photonics. – 2017. – Т. 6, № 3. – С. 16–32.

**Контакты:** Меерович Г.А., e-mail: meerovich@mail.ru

## STUDY OF PHOTSENSITIZER FOR ANTIBACTERIAL PHOTODYNAMIC THERAPY BASED ON CYCLODEXTRIN FORMULATION OF 13<sup>3</sup>-N-(N-METHYLNICOTINYL)-BACTERIOPURPURINIMIDE METHYL ESTER

Meerovich G.A.<sup>1,2</sup>, Akhlyustina E.V.<sup>2</sup>, Tiganova I.G.<sup>3</sup>, Panov V.A.<sup>4</sup>, Tyukova V.S.<sup>4</sup>, Tolordava E.R.<sup>3</sup>, Alekseeva N.V.<sup>3</sup>, Linkov K.G.<sup>1</sup>, Romanova Yu.M.<sup>3</sup>, Grin M.A.<sup>4</sup>, Mironov A.F.<sup>4</sup>, Loshchenov V.B.<sup>1,2</sup>, Kaprin A.D.<sup>5</sup>, Filonenko E.V.<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Prokhorov General Physics Institute RAS, Moscow, Russia

<sup>2</sup>National research nuclear university "MEPHI", Moscow, Russia

<sup>3</sup>N.F. Gamaleya Federal Research Center for Epidemiology & Microbiology, Moscow, Russia

<sup>4</sup>Moscow Technological University MIREA, Moscow, Russia

<sup>5</sup>National Medical Research Radiological Centre of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

### Abstract

Cationic bacteriochlorins are promising as antibacterial photosensitizers (PS) for antibacterial photodynamic therapy. Current work is devoted to the study of properties of new nanostructured cationic photosensitizer based on cyclodextrin dispersion of bacteriochlorine derivative – 13<sup>3</sup>-N-(N-methylnicotinyl)-bacteriopurpurinimide methyl ester, for optimization of dispersion composition and selection of time interval between administration of the PS and photodynamic therapy of infected septic wounds. Specifics of absorption and fluorescence of PS in dependence of its concentration and proportions of components in dispersion was assessed. Pharmacokinetics and biodistribution of PS were studied *in vivo* in organs and tissues of intact mice and septic wounds infected with *P. aeruginosa* or *S. aureus*. The preliminary studies have shown high efficiency of antimicrobial photodynamic therapy of septic wounds with cyclodextrin dispersion of 13<sup>3</sup>-N-(N-methylnicotinyl)-bacteriopurpurinimide methyl ester. Results of study of absorption and spectral and fluorescence properties of its drug formulation depending on its composition allowed to recommend the use of weight ratio 13<sup>3</sup>-N-(N-methylnicotinyl)-bacteriopurpurinimide methyl ester : cyclodextrin about 1:200 and addition of 0,1% Tween 80 to reduce aggregation.

The study showed that 13<sup>3</sup>-N-(N-methylnicotinyl)-bacteriopurpurinimide methyl ester was rapidly cleared from mouse blood circulation: more than 70% – for 2 h, 95% – for 1 day, more than 99% – for 6 days. About 98% was cleared from skin and muscles for 6 days. The long-term (up to 24 h) persistence of PS were observed in liver and kidneys, however more than 99% was cleared for 6 days. Thus, it may be supposed that elimination of PS from mice body is through kidneys and liver. After 24 h partial PS aggregation in tissues, particularly in skin and muscles, was observed. Thus, it may be supposed that the reduce of fluorescence intensity after 24 h later was associated not only with its elimination from body but with its aggregation. Spectral and fluorescence studies showed that 13<sup>3</sup>-N-(N-methylnicotinyl)-bacteriopurpurinimide methyl ester selectively accumulated in septic wounds, fluorescence contrast was in the range of 3–4. The highest values of concentration and selectivity of its accumulation were achieved at 1.5–3 h after intravenous injection. The irradiation 2 h after injection provided high efficacy of the therapy of septic wounds.

**Key words:** antibacterial photodynamic therapy, 13<sup>3</sup>-N-(N-methylnicotinyl)-bacteriopurpurinimide methyl ester, bacteriochlorine derivative, absorption, fluorescence, aggregation, cyclodextrin.

**For citations:** Meerovich G.A., Akhlyustina E.V., Tiganova I.G., Panov V.A., Tyukova V.S., Tolordava E.R., Alekseeva N.V., Linkov K.G., Romanova Yu.M., Grin M.A., Mironov A.F., Loshchenov V.B., Kaprin A.D., Filonenko E.V. Photosensitizer for antibacterial photodynamic therapy based on cyclodextrin formulation of 13<sup>3</sup>-N-(N-methylnicotinyl)-bacteriopurpurinimide methyl ester, *Biomedical Photonics*, 2017, T. 6, No. 3, pp. 16–32 (in Russian).

**Contacts:** Meerovich G.A., e-mail: meerovich@mail.ru

### Введение

Бактериальные инфекции являются серьезной угрозой для здоровья, одной из основных причин смертности пациентов с хирургическими ранами или травматическими повреждениями [1], особенно пациентов с ослабленным иммунитетом. До 75% таких случаев вызвано грамположительными бактериями *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*, стафилококк золотистый) и до 25% – грамотрицательными бактериями *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*, синегнойная

палочка) [2]. Проблема усугубляется тем, что эти бактерии способны образовывать биопленки – сообщества микроорганизмов одного или нескольких видов, защищенные матриксом из экзополимеров, который они сами продуцируют. Бактерии в биопленках устойчивы к внешним воздействиям за счет сниженного метаболизма и наличия матрикса [3–5]. Кроме того, в последнее время из-за нерационального использования антибиотиков в медицине [1, 6] и животновод-

стве появляются бактериальные штаммы с большим разнообразием механизмов резистентности ко многим антибиотикам одновременно. Это делает антибиотикотерапию недостаточно эффективной в лечении бактериальных инфекций, и обуславливает актуальность разработки новых эффективных подходов к борьбе с инфекционными заболеваниями [7].

Грамположительные и грамотрицательные бактерии имеют принципиальные различия в своем строении и чувствительности к лекарственному воздействию. Клеточная стенка грамположительных бактерий имеет относительно высокую степень пористости, и различные макромолекулы, например, гликопептиды и полисахариды с молекулярной массой в диапазоне 30000–60000 Да, достаточно легко диффундируют через плазматическую мембрану [8]. Для наиболее часто используемых фотосенсибилизаторов, молекулярная масса которых обычно не превышает 1500–1800 Да, внешняя стенка грамположительных бактерий не является барьером проницаемости. В то же время внешняя стенка грамотрицательных бактерий обладает дополнительным структурным элементом – наружной мембраной толщиной 10–15 нм, который является внешним по отношению к пептидогликановой сети и имеет очень гетерогенный состав (белки с пориновой функцией, липополисахаридные тримеры и липопротеины, которые создают внешнюю псевдоповерхность плотно упакованных отрицательных зарядов). Такая высокоорганизованная система препятствует проникновению гуморальных защитных факторов организма и запускает механизмы устойчивости ко многим антибиотикам: только относительно гидрофильные соединения с молекулярной массой ниже 600–700 Да диффундируют через пориновые каналы [9, 10]. Взаимодействие катионных соединений с грамотрицательными бактериями, благодаря заряду их поверхности, существенно выше по сравнению с анионными или нейтральными.

Фотодинамическая инактивация бактерий в свободном состоянии и биопленках рассматривается как перспективный способ лечения локальных инфицированных очагов, в частности, инфицированных ран [7, 11], получивший название антибактериальная фотодинамическая терапия (АФДТ). АФДТ способна эффективно разрушать бактериальные клетки без развития резистентности в ответ на облучение [12, 13], не воздействуя при этом, в отличие от антибиотиков, на нормальную микрофлору пациента. При ФДТ молекулы фотосенсибилизатора (ФС), локализованные в биоткани, под воздействием поглощаемого ими света в присутствии внутритканевого молекулярного триплетного кислорода ( $^3\text{O}_2$ ), катализируют образование активных форм кислорода (АФК), в первую очередь – синглетного кислорода ( $^1\text{O}_2$ ). АФК вызывают повреждение бактерий при взаимодействии с разными их

компонентами (в зависимости от внутриклеточной локализации ФС), что в конечном итоге приводит к клеточной гибели [14, 15]. Продемонстрирована восприимчивость к АФДТ многих патогенных микроорганизмов, в том числе устойчивых к антибиотикам штаммов бактерий [1, 16].

Для широкого клинического использования АФДТ важно, чтобы ФС селективно связывался с бактериями, минимально взаимодействуя с эукариотическими клетками [17]. Одним из путей достижения этой цели является создание и использование катионных фотосенсибилизаторов, так как бактерии в целом имеют более выраженный отрицательный заряд по сравнению с эукариотическими клетками, что способствует селективному связыванию катионного ФС с патогенной микрофлорой. Кроме того, связывание ФС с бактериями происходит относительно быстро, в то время как взаимодействие катионного ФС с эукариотическими клетками происходит более медленно, что может дать еще один путь обеспечения высокой селективности при оптимизации временных параметров сенсibilизации [18]. Преимущества АФДТ в качестве потенциальной клинической антибактериальной терапии укрепились, когда стало ясно, что на эффективность АФДТ не влияет резистентность бактерий к антибиотику [19] и, кроме того, до сих пор не обнаружена выработка резистентности [20] к ФС и АФДТ (даже после 20 последовательных циклов частичного уничтожения бактериальной микрофлоры с последующим ее ростом [21]). Еще одним преимуществом является то, что при АФДТ ФС можно применять местно или локально в инфицированном очаге. Было показано, что АФДТ уничтожает бактерии в биопленках как *in vitro*, так и *in vivo* [22]. Разрушение бактерий при АФДТ протекает быстро (секунды), в то время как действие антибиотиков может занять несколько часов или дней, что дает потенциальное преимущество в отношении быстро распространяющихся инфекций. Кроме того, лечение с помощью АФДТ может быть начато до того, как инфекционные агенты будут идентифицированы [23].

Многие инфекции могут возникать глубоко внутри тела, и АФДТ таких очагов может быть реализована путем системного введения ФС и использования для облучения оптоволоконных средств доставки лазерного излучения через эндоскопические или интерстициальные игольные интродьюсеры [24].

Настоящая работа посвящена изучению свойств нового наноструктурированного фотосенсибилизатора на основе циклодекстриновой дисперсии катионного производного бактериохлорина метилового эфира 13<sup>3</sup>-N-(N-метилникотинил)бактериопурпуринамида (КБХ) с целью оптимизации состава дисперсии и выбора времени проведения антибактериальной фотодинамической терапии инфицированных гнойных ран.

В работе решали следующие задачи:

- исследование поглощения и спектрально-флуоресцентных свойств циклодекстриновой дисперсии КБХ в зависимости от соотношения ее компонентов и концентрации фотоактивной субстанции для оценки агрегации ФС и выработки требований по оптимизации состава;
- исследование флуоресценции КБХ в органах и тканях интактных мышей в различные моменты времени после внутривенного введения циклодекстриновой дисперсии для оценки фармакокинетики и биораспределения ФС;
- спектрально-флуоресцентные исследования в динамике содержания и селективности накопления КБХ в инфицированных ранах с целью выбора оптимального времени начала облучения;
- оценка антибактериальной эффективности лекарственного препарата на основе циклодекстриновой дисперсии КБХ оптимизированного состава.

## Материал и методы

Субстанция на основе КБХ [25] получена в Московском технологическом университете совместно с МНИОИ им. П.А.Герцена (филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России) из природного бактериохлорофилла *a* путем последовательных химических модификаций.

Полученная субстанция гидрофобна, поэтому для создания инъекционной формы ее вводили в циклодекстриновый наноноситель. В состав наночастиц входила фотоактивная субстанция КБХ и вспомогательные вещества: гидроксипропил-бета-циклодекстрин (ГПЦД) и Твин-80 (Полисорбат-80).

Изучение фотоинактивации планктонных бактерий проводили на клинических изолятах *S. aureus* 15 и *P. aeruginosa* 21. Бактерии выращивали в питательном бульоне LB или на 1%-ом агаре LB (Difco, США). Для планктонных культур определяли минимальную бактерицидную концентрацию (МБК) ФС в стандартных условиях: инкубация бактерий с ФС 30 мин, плотность дозы облучения 20 Дж/см<sup>2</sup>. Исходный титр бактерий – 1х10<sup>8</sup> КОЕ/мл (колониеобразующих единиц в мл). Использовали двукратные разведения ФС, начиная с 1мМ. После инкубации бактериальную суспензию центрифугировали, ФС удаляли, бактерии ресуспендировали в фосфатном буфере и разливали по 100 мкл из каждой концентрации и контроля без ФС в лунки двух 96-луночных плоскодонных планшетов: 1 – с облучением, 2 – необлученный контроль. Для облучения использовали светодиодный источник СФД-М-820 с длиной волны спектрального максимума 820 нм, полушириной спектра 35 нм и плотностью мощности около 50 мВт/см<sup>2</sup>. Плотность мощности контролировали с помощью измерителя мощности «Coherent labmax» («Coherent», США), и она

составляла 27 мВт/см<sup>2</sup>. После облучения 50 мкл раствора из каждой лунки высевали на чашки Петри с LB агаром и инкубировали в темноте при 37°C в течение 20 ч. Отмечали наименьшую концентрацию ФС, высев из которой не давал роста. Эту концентрацию принимали за минимальную бактерицидную концентрацию (МБК).

Исследования *in vivo* проводили на иммунокомпетентных мышах BALB/c, самцах массой 20–22 г. ФС вводился в хвостовую вену однократно струйно.

Для создания инфицированных гнойных ран использовали методику, предложенную в [26]. Хирургические раны у мышей инфицировали клиническими изолятами *P. aeruginosa* 21 или *S. aureus* 15, которые вызывали гнойную раневую инфекцию у мышей, но при этом не приводили к генерализованной инфекции и гибели мышей. Доза заражения составляла 1х10<sup>7</sup> КОЕ/мышь. Местное обезболивание при исследованиях проводили спреем или инъекцией 10%-го лидокаина, обездвиживали животное внутримышечным введением препарата золетил (из расчета 40 мг/кг массы животного). Животных подвергали эвтаназии методом цервикальной дислокации.

Исследования фармакокинетики на интактных мышах проводили на опытных группах из 3 животных по 1 группе на каждую временную точку. Исследования фармакокинетики на мышах с инфицированными ранами проводили на 2 опытных группах из 3 животных в группе. Для изучения эффективности АФДТ инфицированных гнойных ран использовали 4 группы мышей с ранами, инфицированными *P. aeruginosa* 21 или *S. aureus* 15 (2 опытных и 2 контрольных группы по 6 животных в группе).

Для облучения использовали светодиодный источник СФД-М-820 на основе светодиодов с длиной волны спектрального максимума 820 нм, полушириной спектра 35 нм и плотностью мощности около 50 мВт/см<sup>2</sup>.

В работе проводили изучение оптико-спектральных и спектрально-флуоресцентных свойств КБХ в растворах, а также органах и тканях животных *in vivo* и *ex vivo*. Поглощение ФС в широком диапазоне концентраций изучали в двухлучевом спектрофотометре «Hitachi U-3410» («Hitachi», Япония). Спектрально-флуоресцентные исследования в широком диапазоне значений концентрации (от 0,001 мМ до 1 мМ) проводили с использованием спектроанализатора ЛЭСА-01 «БИОСПЕК» (ЗАО «БИОСПЕК», Россия). Возбуждение флуоресценции осуществляли лазерным излучением с длиной волны 785 нм, возбуждающим флуоресценцию благодаря поглощению КБХ на коротковолновом краю основной полосы либо с длиной волны 532 нм, попадающей в его Q<sub>1</sub>-полосу.

Для повышения точности исследований, увеличения отношения «сигнал-шум» и расширения динами-



ческого диапазона спектроанализатора учитывали аппаратную функцию экспериментальной установки. В связи с этим регистрируемый сигнал делили на время накопления сигнала и мощность возбуждающего лазерного излучения.

## Результаты и обсуждение

### *Поглощение и флуоресценция циклодекстриновой дисперсии фотосенсибилизатора*

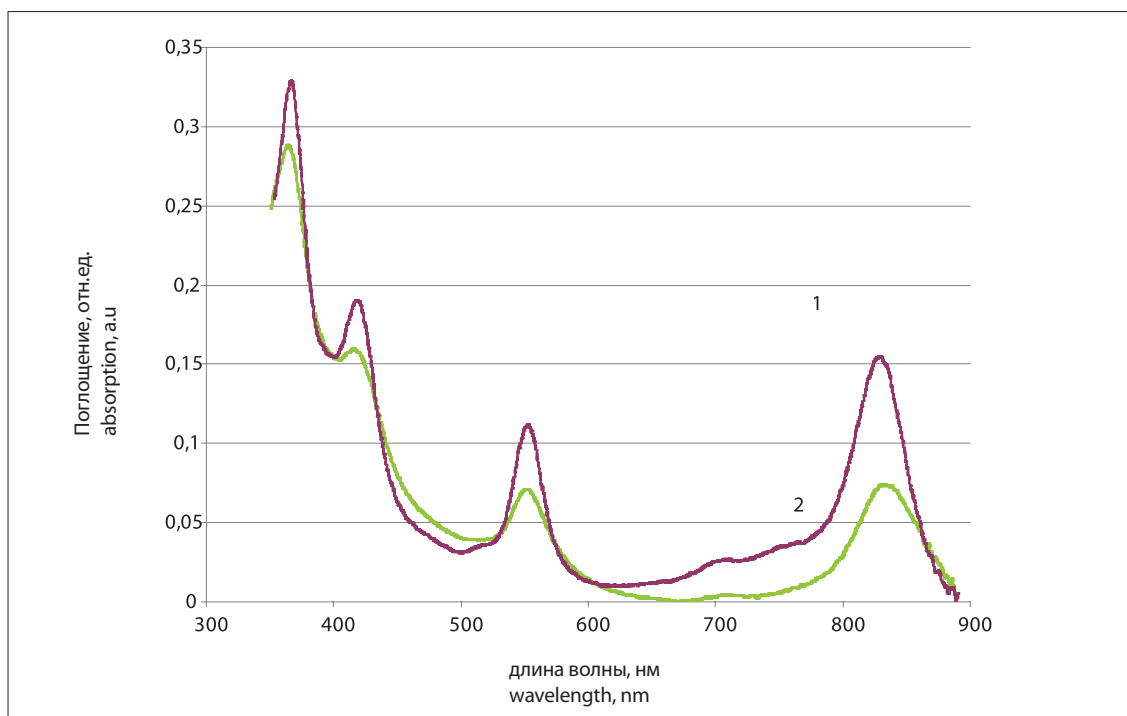
Для оптимизации состава циклодекстриновой дисперсии КБХ изучали его влияние на поглощение и флуоресценцию. Исследования образцов с разным содержанием Твин-80 показали (рис. 1), что при низком его содержании (0,01–0,05% от общей массы дисперсии) наблюдается уширение спектра и снижение интенсивности поглощения. Это может быть связано с агрегацией КБХ. Увеличение содержания Твин-80 до максимально разрешенного уровня для лекарственных средств (0,1%) привело к существенному сужению спектрального пика и увеличению его амплитуды.

Зависимость оптической плотности интегрального поглощения дисперсии КБХ с содержанием Твин-80 0,1% в полосе 827±20 нм от молярной концентрации КБХ при толщине кюветы 1 мм представлена на рис. 2. Эта зависимость близка к линейной, что позволяет высказать предположение о преобла-

дании в дисперсии неагрегированной формы изучаемого соединения [27].

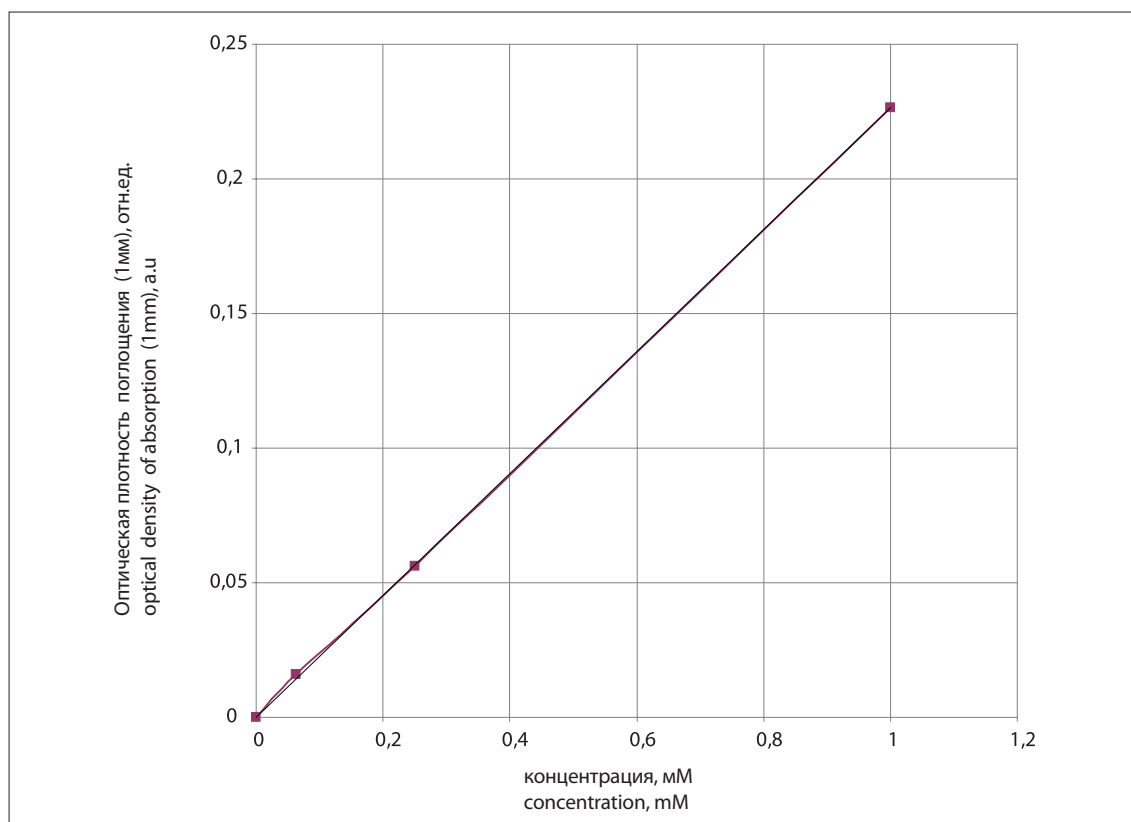
Оптимизацию соотношения компонентов дисперсии КБХ при содержании Твин-80, равном 0,1%, проводили под спектрально-флуоресцентным контролем, варьируя массовое соотношение КБХ к циклодекстрину и изменяя концентрацию КБХ от 1 мМ до 0,03 мМ путем разбавления дисперсии дистиллированной водой. Характерные спектры флуоресценции дисперсий КБХ разной концентрации при возбуждении излучением с длиной волны 785 нм приведены на рис. 3, а зависимость интегральной интенсивности флуоресценции (площади под спектральной кривой) от концентрации – на рис. 4.

Зависимость интегральной интенсивности флуоресценции от концентрации сублинейна, хотя в рабочем диапазоне концентраций (<0,2 мМ) близка к линейной. Наблюдаемые явления, проявляющиеся в сублинейной зависимости интенсивности флуоресценции от концентрации, могут быть связаны, предположительно, с двумя явлениями. Одно из таких явлений обусловлено перепоглощением коротковолнового края спектра флуоресценции с последующим переизлучением в той же полосе, вследствие чего спектральный максимум флуоресценции полосы сдвигается в сторону ее длинноволнового края. Явление характерно для фотосенси-



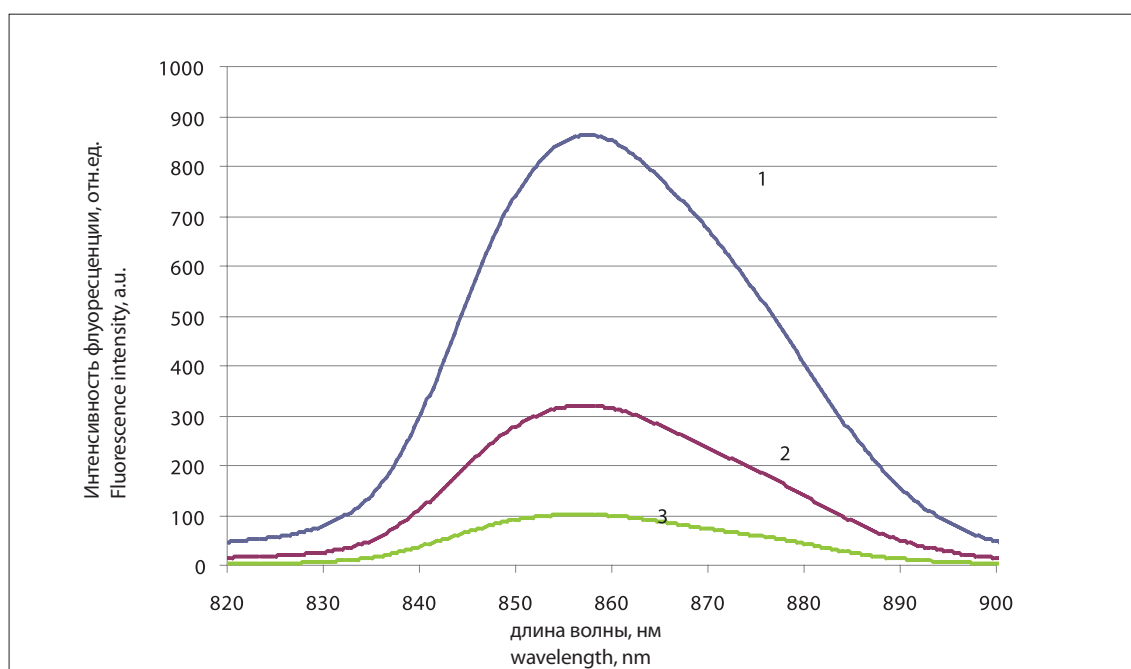
**Рис. 1.** Спектры поглощения лекарственного средства (концентрация метилового эфира 13<sup>3</sup>-N-(N-метилникотинил)бактериопурпуринимида 1 мМ, массовое соотношение метиловый эфир 13<sup>3</sup>-N-(N-метилникотинил)бактериопурпуринимида : циклодекстрин = 1:74) с разным содержанием Твин-80: 1 – 0,1%; 2 – 0,01%

**Fig. 1.** Absorption spectra of PS (the concentration of 13<sup>3</sup>-N-(N-methylnicotinyl)-bacteriopurpurinimide methyl ester of 1 mM, the mass ratio of 13<sup>3</sup>-N-(N-methylnicotinyl)-bacteriopurpurinimide methyl ester to cyclodextrin is 1:74) with different concentrations of Tween-80: 1 – 0.1%, 2 – 0.01%



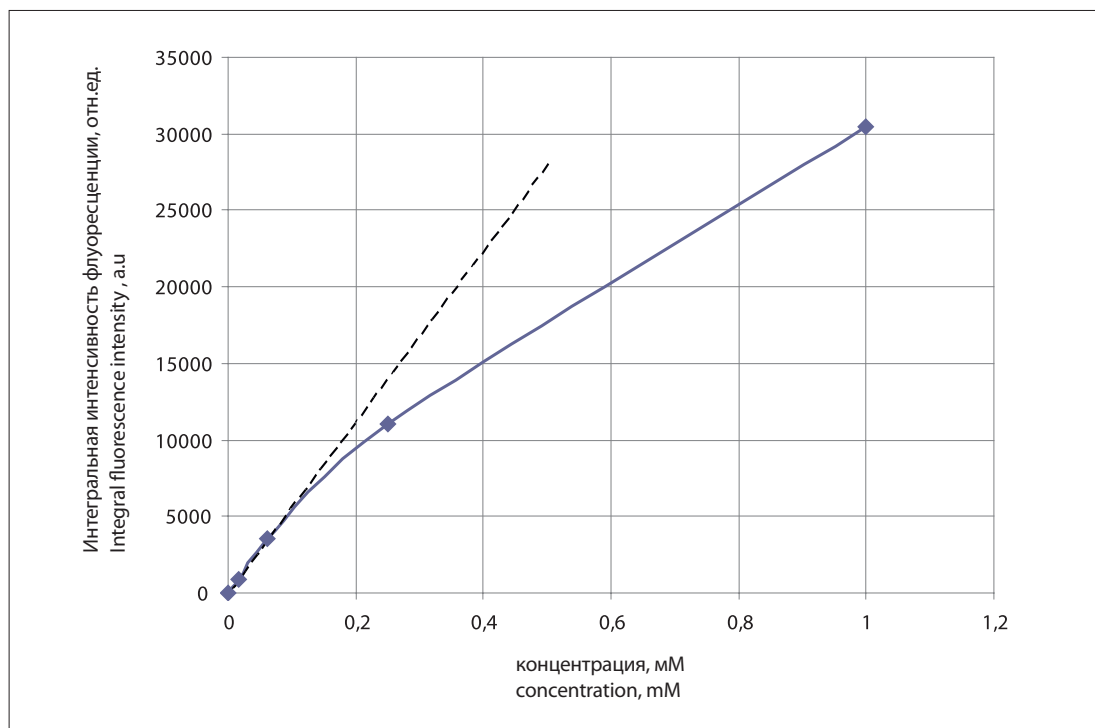
**Рис. 2.** Зависимость оптической плотности интегрального поглощения в полосе  $827 \pm 20$  нм от молярной концентрации метилового эфира  $13^3$ -N-(N-метилникотинил)бактериопурпуринида (кювета 1 мм)

**Fig. 2.** Dependence of integral optical absorption in  $827 \pm 20$  nm range on molar concentration of  $13^3$ -N-(N-methylnicotinyl)-bacteriopurpurinimide methyl ester (optical path 1 mm)



**Рис. 3.** Спектры флуоресценции метилового эфира  $13^3$ -N-(N-метилникотинил)бактериопурпуринида (массовое соотношение метилового эфира  $13^3$ -N-(N-метилникотинил)бактериопурпуринида : циклодекстрин = 1:117) в разных концентрациях: 1 – 1,0 мМ; 2 – 0,25 мМ; 3 – 0,0625 мМ

**Fig. 3.** Fluorescence spectra of  $13^3$ -N-(N-methylnicotinyl)-bacteriopurpurinimide methyl ester (the mass ratio of  $13^3$ -N-(N-methylnicotinyl)-bacteriopurpurinimide methyl ester to cyclodextrin 1:117) at different concentrations: (1) 1.0 mM; (2) 0.25 mM; (3) 0.0625 mM



**Рис. 4.** Зависимость интегральной интенсивности флуоресценции в полосе  $857 \pm 26$  нм от молярной концентрации метилового эфира 13<sup>3</sup>-N-(N-метилникотинил)бактериопурпуринида (массовое соотношение метиловый эфир 13<sup>3</sup>-N-(N-метилникотинил)бактериопурпуринида : циклодекстрин = 1:117)

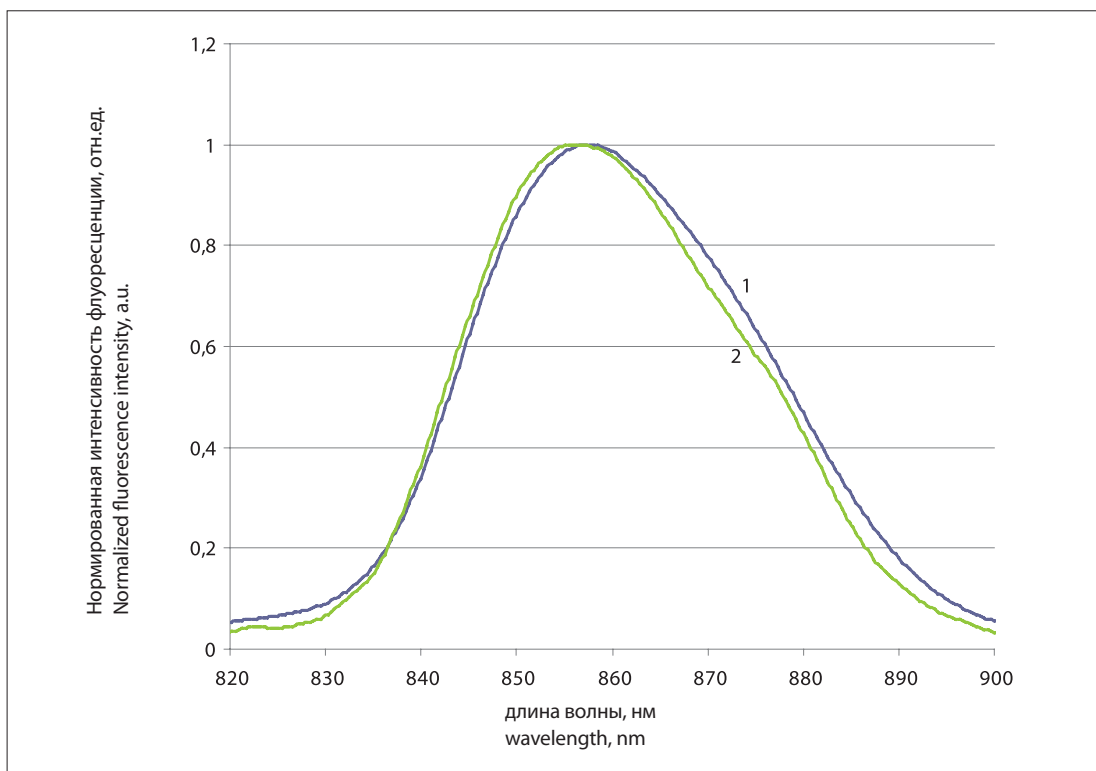
**Fig. 4.** Dependence of integral fluorescence intensity in the  $857 \pm 26$  nm band on molar concentration of 13<sup>3</sup>-N-(N-methylnicotinyl)-bacteriopurpurinimide methyl ester (the mass ratio of 13<sup>3</sup>-N-(N-methylnicotinyl)-bacteriopurpurinimide methyl ester to cyclodextrin 1:117)

билизаторов с высокой степенью спектрального перекрытия между спектрами поглощения и флуоресценции и невысоким квантовым выходом флуоресценции; оно проявляется как в агрегирующих, так и в неагрегирующих системах [28]. Сравнение формы спектров дисперсий с разными концентрациями КБХ, полученными при двух значениях соотношения КБХ : циклодекстрин, обнаруживает сдвиг максимума в длинноволновую область при увеличении концентрации. Это подтверждает предположение о перепоглощении, с которым связана сублинейность зависимости интенсивности флуоресценции от концентрации. Перепоглощение может влиять на характеристики флуоресцентной диагностики, но оно, в первом приближении, не сказывается на эффективности ФДТ.

С другой стороны, на форму спектра и полуширину его спектрального контура может влиять агрегация молекул фотосенсибилизатора. Поскольку при агрегации молекул тетрапирролов снижается время жизни их возбужденного состояния, снижается и эффективность передачи энергии молекулярному кислороду, а значит, снижается скорость образования синглетного кислорода и эффективность ФДТ, а также ухудшаются флуоресцентные свойств. Кроме

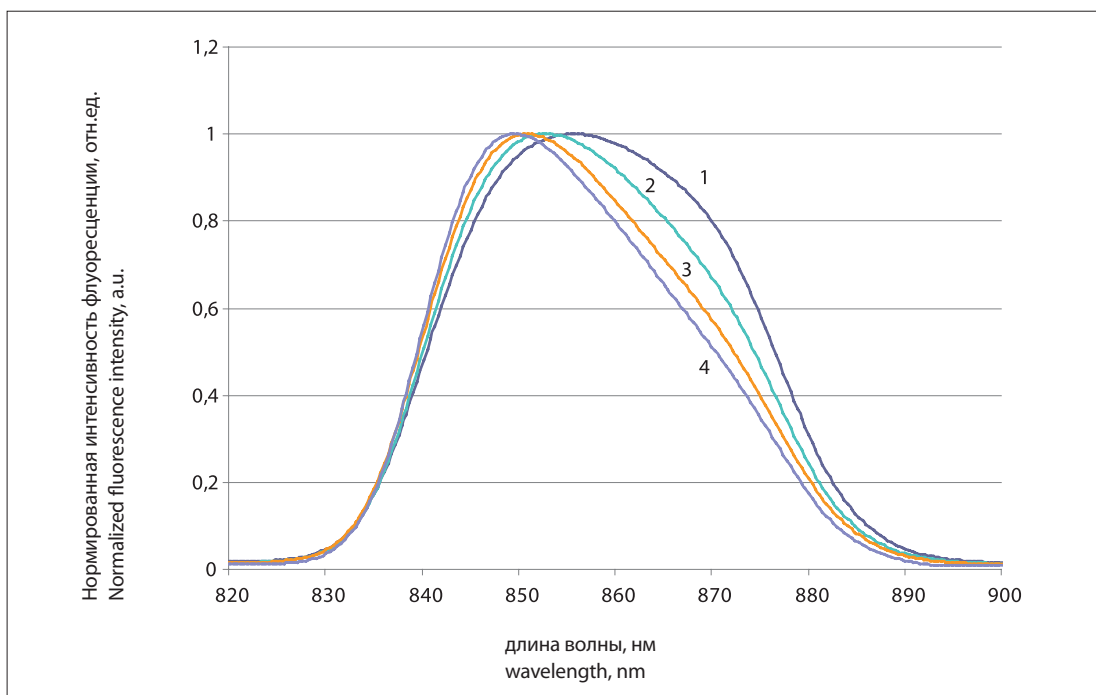
того, поскольку спектры поглощения агрегатов не совпадают со спектром поглощения неагрегированных молекул, то полоса поглощения уширяется, а интенсивность поглощения (экстинкция) в основной полосе уменьшается, что также может привести к снижению фотодинамической эффективности.

Для оценки изменения формы спектрального контура и полуширины спектров флуоресценции в зависимости от содержания КБХ вычисляли нормированную интенсивность флуоресценции. Для этого спектры флуоресценции делили на значение интенсивности в их спектральном максимуме. Полученные кривые, по существу, описывали форму спектральных контуров. Анализ результатов, приведенных на рис. 5 и 6 показал, что при более высоких значениях массового соотношения КБХ : циклодекстрин спектр флуоресценции уширен, полуширина спектра заметно больше даже при невысоком содержании КБХ в дисперсии из-за уширения и изменения формы длинноволнового края спектра. В этой спектральной области находятся полосы флуоресценции тримерных и тетрамерных агрегатов, и наблюдается, предположительно, суммарный спектр флуоресценции КБХ в мономолекулярном и агрегированном состоя-



**Рис. 5.** Форма спектров флуоресценции метилового эфира  $13^3$ -N-(N-метилникотинил)бактериопурпуринида (массовое соотношение метилового эфира  $13^3$ -N-(N-метилникотинил)бактериопурпуринида : циклодекстрин = 1:117) с разными концентрациями: 1 – 1 mM; 2 – 0,0625 mM

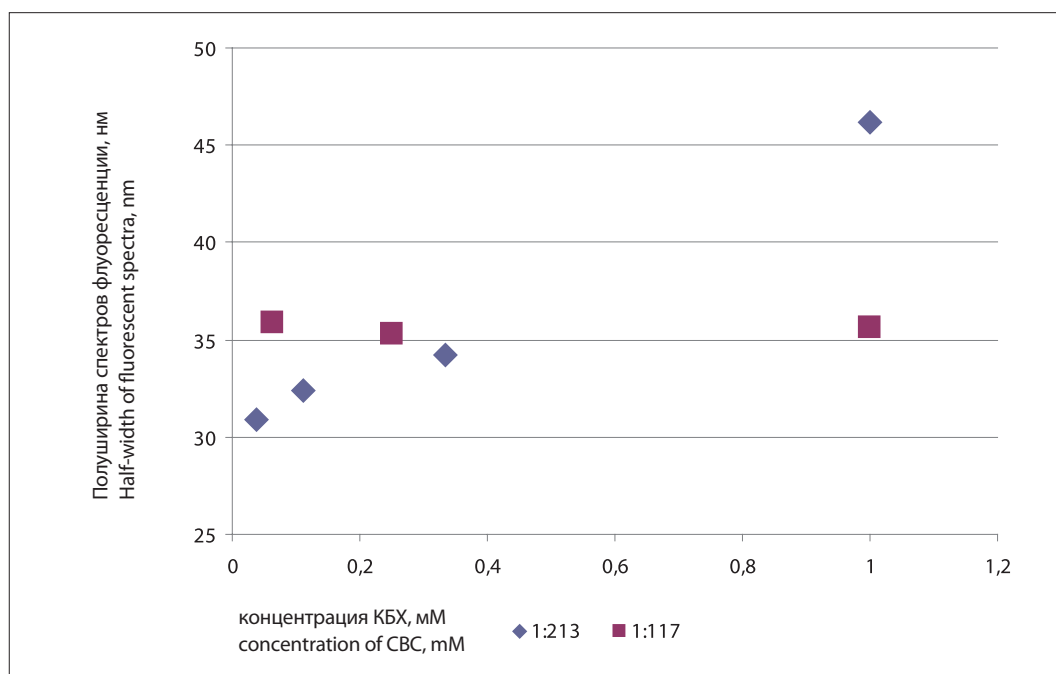
**Fig. 5.** Shape of fluorescence spectra of  $13^3$ -N-(N-methylnicotinyl)-bacteriopurpurinimide methyl ester (the mass ratio of  $13^3$ -N-(N-methylnicotinyl)-bacteriopurpurinimide methyl ester to cyclodextrin 1:117) at different concentrations: 1 – 1 mM; 2 – 0.0625 mM



**Рис. 6.** Форма спектров флуоресценции метилового эфира  $13^3$ -N-(N-метилникотинил)бактериопурпуринида (массовое соотношение метилового эфира  $13^3$ -N-(N-метилникотинил)бактериопурпуринида : циклодекстрин = 1:213) с разными концентрациями: 1 – 1 mM; 2 – 0,33 mM; 3 – 0,11 mM; 4 – 0,037 mM

**Fig. 6.** Shape of fluorescence spectra of  $13^3$ -N-(N-methylnicotinyl)-bacteriopurpurinimide methyl ester (the mass ratio of  $13^3$ -N-(N-methylnicotinyl)-bacteriopurpurinimide methyl ester to cyclodextrin 1:213) at different concentrations: 1 – 1 mM; 2 – 0.33 mM; 3 – 0.11 mM; 4 – 0.037 mM





**Рис. 7.** Полуширина спектров флуоресценции метилового эфира 13<sup>3</sup>-N-(N-метилникотинил)бактериопурпуринамида (КБХ) в зависимости от концентрации для разных соотношений метиловый эфир 13<sup>3</sup>-N-(N-метилникотинил)бактериопурпуринамида : циклодекстрин  
**Fig. 7.** Dependence of half-width of fluorescent spectra on the concentration of 13<sup>3</sup>-N-(N-methylnicotinyl)-bacteriopurpurinimide methyl ester (CBC) for different of 13<sup>3</sup>-N-(N-methylnicotinyl)-bacteriopurpurinimide methyl ester to cyclodextrin mass ratios

нии [29]. Спектры флуоресценции дисперсий с меньшими значениями соотношения КБХ : циклодекстрин в рабочем диапазоне концентраций (<0,2 мМ) имеют заметно меньшую полуширину. Это позволяет сделать вывод, что в таких дисперсиях молекулы КБХ в циклодекстриновых наноносителях существенно меньше агрегированы, т.е. уменьшение соотношения КБХ : циклодекстрин способствует снижению агрегации. Но при высоких (0,2–1,0 мМ) концентрациях в них происходит уширение в области длинноволнового края: проявляется в виде «плеча» дополнительный пик с максимумом примерно при 865–870 нм и увеличивается полуширина. Это позволяет предположить, что в изучаемых дисперсиях реализуется два механизма агрегации, один из которых связан с взаимодействием молекул КБХ внутри циклодекстринового комплекса, другой происходит при сближении циклодекстриновых комплексов друг с другом.

С учетом полученных результатов для дальнейших биологических исследований использовали циклодекстриновую дисперсию с содержанием Твин-80 0,1%, при массовом соотношении КБХ : циклодекстрин не более 1:200.

Результаты исследования нормированной интенсивности флуоресценции в органах и тканях мышей приведены в табл. 1.

Как видно из табл. 1, КБХ быстро выводится из кровотока мышей (более 70 % выводится за 2 ч, более 95% – за 1 сут, более 99% – за 6 сут). КБХ накапливается и удержи-

вается в значительной концентрации в печени и почках в течение 24 ч (его содержание в этих органах через 24 ч составляет 40% и 45% от максимальных значений, соответственно); за 6 сут из этих органов выводится более 99%. Это позволяет предположить, что основные пути элиминирования КБХ из организма мышей проходят через почки и печень.

В коже и мышцах через 24 ч после введения концентрация КБХ составляет 22% и 34% соответственно, от максимальных значений, а через 6 сут она составляет около 2%.

Для количественной оценки содержания КБХ (по крайней мере, в крови) была изучена зависимость интенсивности флуоресценции, регистрируемой системой на основе ЛЭСА при фиксированной геометрии опыта, от количественного содержания КБХ в плазме крови. Результаты приведены на рис. 8.

Из полученных данных следует, что эта зависимость с высокой точностью может быть описана полиномом 2-ой степени:

$$I = 49922 C - 79398 C^2,$$

а в диапазоне значений концентрации до 0,05 мМ (0,043 мг/мл), соответствующем содержанию КБХ в органах и тканях на временном отрезке, в котором проводится ФДТ, – линейной функцией

$$I = 43688 C,$$

где  $I$  – нормированная интенсивность флуоресценции [отн.ед.],  $C$  – концентрация КБХ в плазме [мг/мл].

Таблица 1

Интенсивность (усл.ед.) флуоресценции метилового эфира 13<sup>3</sup>-N-(N-метилникотинил)бактериопурпуринимида в органах и тканях мышей при внутривенном введении в дозе 20 мг/кг в зависимости от времени после введения

Table 1

Intensity of 13<sup>3</sup>-N-(N-methylnicotinyl)-bacteriopurpurinimide methyl ester fluorescence in organs and tissues of mice in dependence on time after intravenous administration in a dose of 20 mg/ kg

Органы и ткани Organs and tissues	Интенсивность флуоресценции метилового эфира 13 <sup>3</sup> -N-(N-метилникотинил)бактериопурпуринимида (усл.ед.) Intensity of 13 <sup>3</sup> -N-(N-methylnicotinyl)-bacteriopurpurinimide methyl ester fluorescence (r.u.)					
	5 мин 5 min	30 мин 30 min	2 ч 2 h	4 ч 4 h	24 ч 24 h	6 сут 6 d
Печень Liver	1200±100	1690±480	2440±315	1225±150	965±70	23±3
Селезенка Spleen	400±65	395±65	349±30	340±65	235±45	7±1
Почки Kidney	890±90	1065±230	1270±121	930±240	480±50	8±1
Сердце Heart	350±160	330±100	335±85	200±25	70±40	3±1
Легкие Lung	2175±470	1235±195	1255±205	670±170	310±70	4±2
Плазма крови Blood plasma	3475±290	1415±350	990±280	930±235	165±75	2±1
Кожа Skin	360±90	715±130	585±120	195±70	160±40	9±2
Мышца Muscle	65±10	160±35	140±30	85±25	55±15	4±1

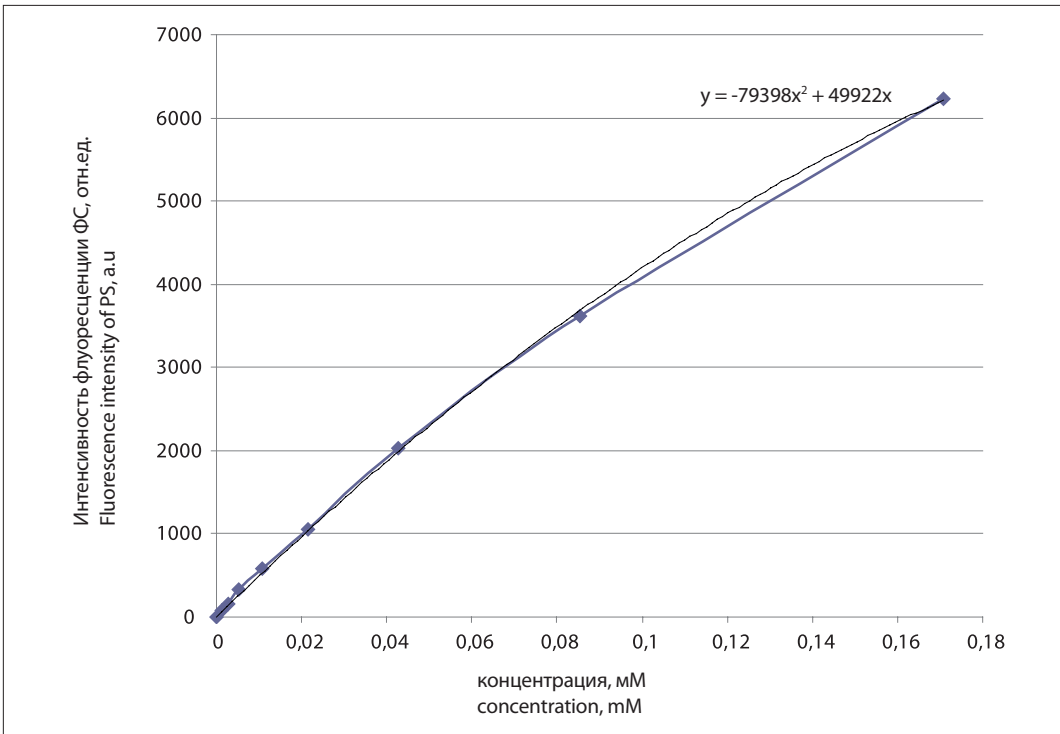


Рис. 8. Зависимость интенсивности флуоресценции от концентрации метилового эфира 13<sup>3</sup>-N-(N-метилникотинил)бактериопурпуринимида в плазме крови

Fig. 8. Dependence of fluorescence intensity on 133-N-(N-methylnicotinyl)-bacteriopurpurinimide methyl ester concentration in blood plasma

На рис. 9 представлена кривая «концентрация – время» для плазмы крови при внутривенном введении КБХ в дозе 20 мг/кг.

Использование полученных результатов позволяет оценить фармакокинетические параметры для плазмы крови животных, которым был введен внутривенно КБХ:

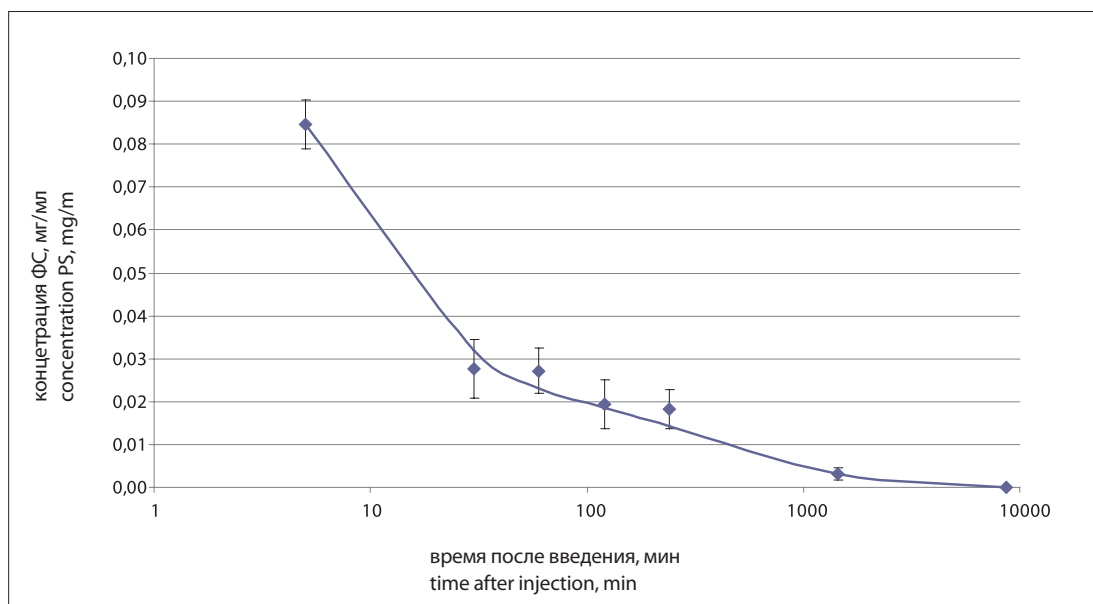
- период полувыведения КБХ (время, необходимое для уменьшения вдвое концентрации КБХ в крови)  $T_{1/2} = 3,1$  ч;
- объем распределения КБХ (условный объем жидкости, в котором нужно растворить всю попавшую в организм дозу КБХ, чтобы получилась концентрация, равная начальной концентрации в сыворотке крови)  $V_d = 4,7$  см<sup>3</sup>;
- общий клиренс (отражает объем тест-ткани, освобождающийся от КБХ в единицу времени, который определяется отношением дозы к площади под кривой «концентрация – время»)  $Cl_T = 0,8$  см<sup>3</sup>/ч.

Исследования флуоресценции КБХ в органах и тканях животных показывают, что, несмотря на различия в интенсивности спектров в разных органах в первые часы после введения, формы их спектральных контуров достаточно близки как между собой, так и со спектральным контуром флуоресценции вводимой дисперсии. Однако с течением времени меняется не только интенсивность флуоресценции, но претерпевает изменения и форма спектра. Через 24 ч после введения в кожу и мышечной ткани наблюдается существенное уширение спектрального контура с длинноволновой стороны (рис. 10).

Полученные результаты позволяют предположить, что уменьшение интенсивности флуоресценции КБХ через 24 и более часов связано не только с его элиминацией из организма, но и с агрегацией.

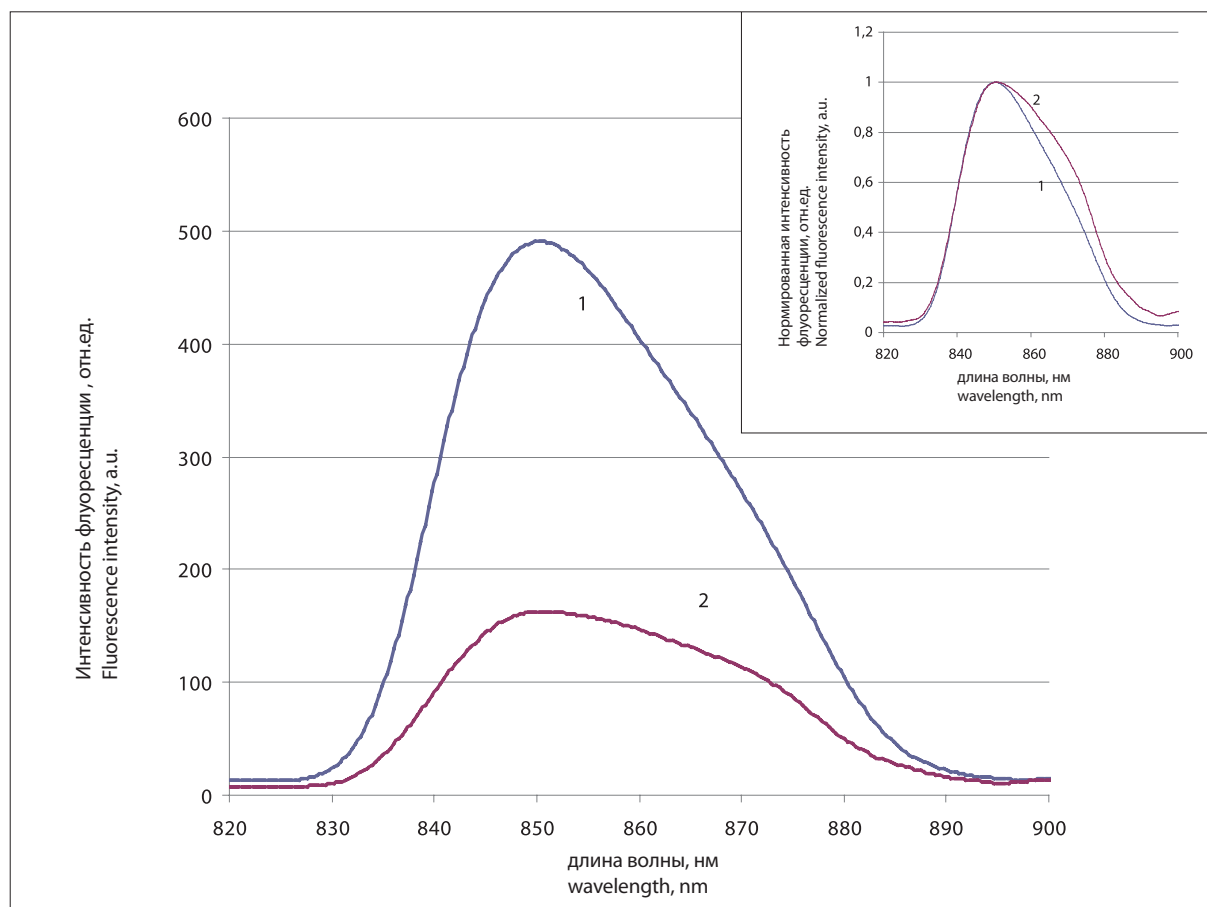
При исследовании инфицированных *S. aureus* или *P. aeruginosa* ран с использованием 2D-системы на основе высокочувствительной CCD-камеры с узкополосным интерференционным фильтром FF01-857/30-25 (Semrock, США) обнаружено, что распределение интенсивности флуоресценции по гнойным ранам неоднородно. В ранах, инфицированных *S. aureus*, участки с повышенной интенсивностью локализованы в основном в центральной части раны, а в ранах, инфицированных *P. aeruginosa*, – преимущественно в периферической части. Это согласуется с микробиологическими данными о локализации биопленок *S. aureus* и *P. aeruginosa* в гнойных ранах.

Спектрально-флуоресцентные исследования у мышей с инфицированными гнойными ранами (рис. 11–12) позволили оценить в динамике уровень нормированной флуоресценции с целью выбора оптимального интервала времени для начала облучения и вычислить флуоресцентную контрастность как отношение интенсивности нормированной флуоресценции в ране по отношению к интенсивности нормированной флуоресценции в прилегающей ткани (коже). Высокая интенсивность флуоресценции в ране наблюдается уже через 30 мин после внутривенного введения КБХ в концентрации 1 мМ (доза 20 мг/кг массы тела мышей) и вплоть до 24 ч после введения. Интенсивность



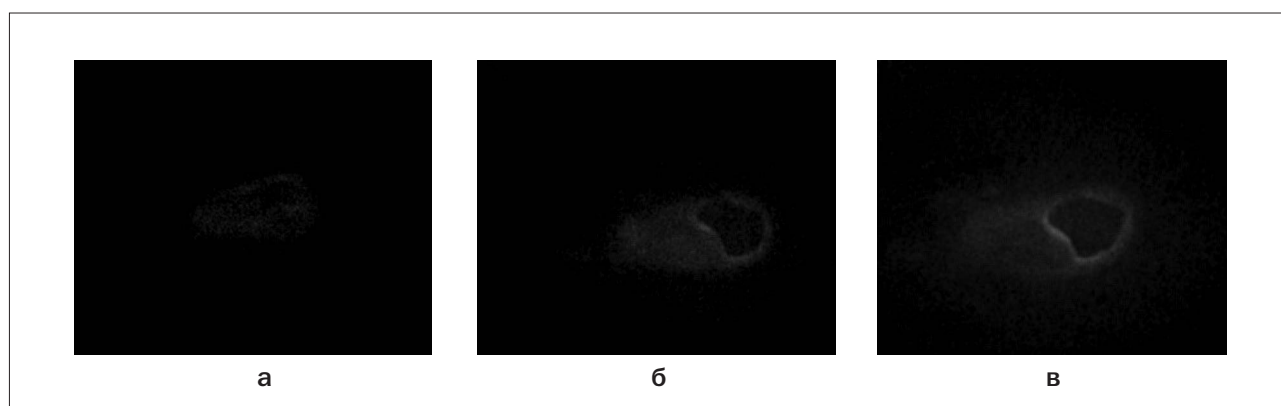
**Рис. 9.** Динамика изменения концентрации метилового эфира 13<sup>3</sup>-N-(N-метилникотинил)бактериопурпуринамида в плазме крови после введения мышам в дозе 20 мг/кг

**Fig. 9.** Dependence of 13<sup>3</sup>-N-(N-methylnicotinyl)-bacteriopurpurinimide methyl ester concentration in blood plasma of mice on time after administration at a dose of 20 mg/kg



**Рис. 10.** Спектры флуоресценции метилового эфира  $13^3$ -N-(N-метилникотинил)бактериопурпуринимида в коже через 2 ч (1) и 24 ч (2) после внутривенного введения в дозе 20 мг/кг. На вкладке спектры флуоресценции нормированы делением на интенсивность флуоресценции в спектральном максимуме полосы

**Fig. 10.** Fluorescence spectra of  $13^3$ -N-(N-methylnicotinyl)-bacteriopurpurinimide methyl ester in the skin of mice 2 h (1) and 24 h (2) after administration at a dose of 20 mg/kg. Insert: Fluorescent spectra normalized on intensity at their spectral maxima

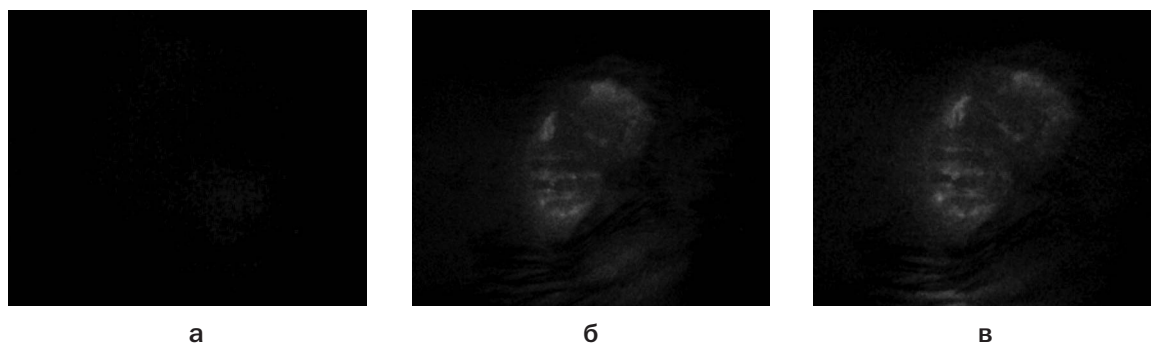


**Рис. 11.** Флуоресцентные изображения инфицированной *P. aeruginosa* раневой поверхности кожи мышей, полученные через разные интервалы времени после введения метилового эфира  $13^3$ -N-(N-метилникотинил)бактериопурпуринимида:

- а – до введения;
- б – через 90 мин после введения;
- в – через 120 мин после введения

**Fig. 11.** Fluorescence images of a wound surface of the mice infected by *P. aeruginosa*, at different time intervals after the intravenous administration of  $13^3$ -N-(N-methylnicotinyl)-bacteriopurpurinimide methyl ester:

- а – before administration;
- б – 90 min after administration;
- в – 120 min after administration



**Рис. 12.** Флуоресцентные изображения инфицированной *S. aureus* раневой поверхности кожи мышей через разные интервалы времени после внутривенного введения метилового эфира  $13^3\text{-N}$ -( $\text{N}$ -метилникотинил)бактериопурпуринамида:

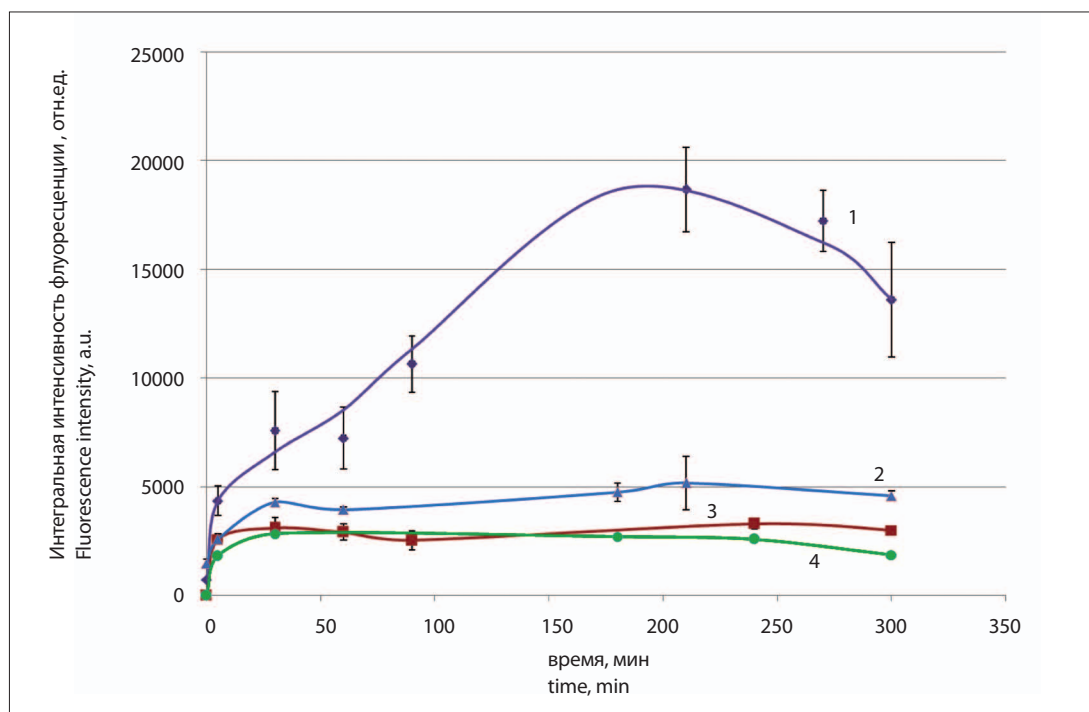
- а – до введения;  
 б – через 30 мин после введения;  
 в – через 120 мин после введения

**Fig. 12.** Fluorescence images of a wound surface of the mice skin infected by *S. aureus*, at different time intervals after the intravenous administration of  $13^3\text{-N}$ -( $\text{N}$ -methylnicotinyl)-bacteriopurpurinimide methyl ester:

- а – before administration;  
 б – 30 min after administration;  
 в – 120 min after administration

флуоресценции в неинфицированной ране незначительно (примерно в 1,5 раза) превышает интенсивность флуоресценции на прилегающих участках кожи; интенсивность флуоресценции в инфицированной ране значительно выше, селективность

накопления в ней по отношению к нормальной коже (флуоресцентная контрастность) через 2–4 ч после введения КБХ достигает 3,6. Таким образом, накопление КБХ происходит в очаге инфекционного процесса.



**Рис. 13.** Интегральная интенсивность флуоресценции раневой поверхности и кожи у мышей, инфицированных *P. aeruginosa*, в зависимости от времени после внутривенного введения метилового эфира  $13^3\text{-N}$ -( $\text{N}$ -метилникотинил)бактериопурпуринамида: 1 – инфицированная рана; 2 – неинфицированная рана; 3, 4 – кожа

**Fig. 13.** Integral intensity of fluorescence of wound surface and skin of mice infected by *P. aeruginosa* at different time intervals after the intravenous administration of  $13^3\text{-N}$ -( $\text{N}$ -methylnicotinyl)-bacteriopurpurinimide methyl ester: 1 – infected wound; 2 – non-infected wound; 3, 4 – skin



В экспериментах *in vitro* была оценена минимальная бактерицидная концентрация (МБК) по отношению к антибиотикорезистентным клиническим изолятам *S. Aureus* 15 и *P. Aeruginosa* 21, которые вызывали раневую инфекцию на модели хирургической раны (табл. 2–3). Исследования проводили при времени инкубации бактерий с КБХ 30 мин, и плотности дозы облучения 20 Дж/см<sup>2</sup>.

Таким образом, МБК КБХ в выбранных условиях составляет 1,6 мкМ по отношению к *S. Aureus* 15 и 500 мкМ по отношению к *P. Aeruginosa* 21.

При АФДТ инфицированных гнойных ран с использованием ФС оптимизированного состава облучение, в соответствии с полученными результатами, начинали через 2–3 ч после внутривенного введения дисперсии. Доза облучения составляла 15 Дж/см<sup>2</sup>. Мышам, инфицированным *P. aeruginosa*, вводили ФС в дозе 20 мг/кг, инфицированным *S. aureus* – 10 мг/кг. В результате АФДТ достигнуто сокращение сроков эпителизации у мышей ран, инфицированных *P. aeruginosa*, с 15 до 8 дней (рис. 14), а ран, инфицированных *S. aureus*, с 11 до 7 дней (рис. 15).

**Таблица 2**

Фотодинамическая инактивация патогенных бактерий *S. aureus* 15 при разных концентрациях метилового эфира 13<sup>3</sup>-N-(N-метилникотинил)бактериопурпуринимида

**Table 2**

Photodynamic inactivation of pathogenic bacteria *S. aureus* 15 for different concentrations of 13<sup>3</sup>-N-(N-methylnicotinyl)-bacteriopurpurinimide methyl ester

Штамм Strain	Концентрация метилового эфира 13 <sup>3</sup> -N-(N-метилникотинил)бактериопурпуринимида (мкМ) Concentration of 13 <sup>3</sup> -N-(N-methylnicotinyl)-bacteriopurpurinimide methyl ester (μM)										Доза света (Дж/см <sup>2</sup> ) Light dose (J/cm <sup>2</sup> )
	100	50	25	12,5	6,3	3,1	1,6	0,8	0,4	0,2	
<i>S. aureus</i> 15	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0
<i>S. aureus</i> 15	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	20

«-» отсутствие бактерий, «+» наличие бактерий

«-» absence of bacteria, «+» presence of bacteria

**Таблица 3**

Фотодинамическая инактивация патогенных бактерий *P. aeruginosa* 21 при разных концентрациях метилового эфира 13<sup>3</sup>-N-(N-метилникотинил)бактериопурпуринимида

**Table 3**

Photodynamic inactivation of pathogenic bacteria *P. aeruginosa* 21 for different concentrations of 13<sup>3</sup>-N-(N-methylnicotinyl)-bacteriopurpurinimide methyl ester

Штамм Strain	Концентрация метилового эфира 13 <sup>3</sup> -N-(N-метилникотинил)бактериопурпуринимида (мкМ) Concentration of 13 <sup>3</sup> -N-(N-methylnicotinyl)-bacteriopurpurinimide methyl ester (μM)										Доза света (Дж/см <sup>2</sup> ) Light dose (J/cm <sup>2</sup> )
	1000	500	250	125	63	31	16	8	4	2	
<i>P. aeruginosa</i> 21	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+	0
<i>P. aeruginosa</i> 21	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	20

«-» отсутствие бактерий, «+» наличие бактерий

«-» absence of bacteria, «+» presence of bacteria



**Рис. 14.** Динамика заживления инфицированных *P. aeruginosa* ран:

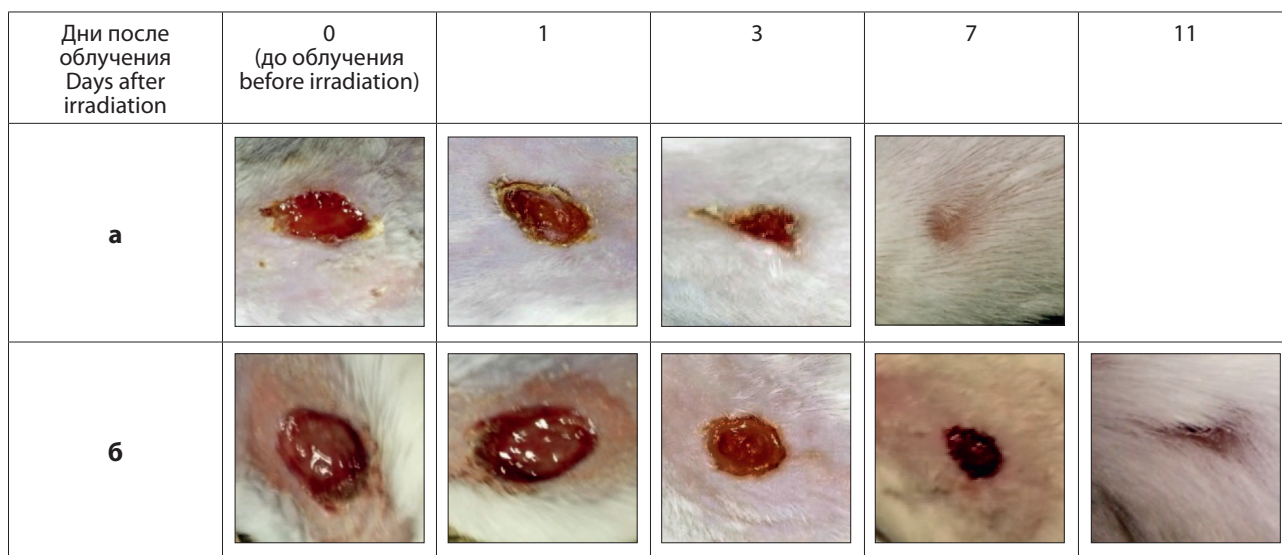
а – после ФДТ;

б – без ФДТ

**Fig. 14.** Dynamics of regeneration of wounds infected by *P. aeruginosa*:

а – after PDT;

б – without PDT



**Рис. 15.** Динамика заживления инфицированных *S. aureus* ран:

а – после ФДТ;

б – без ФДТ

**Fig. 15.** Dynamics of regeneration of wounds infected by *S. aureus*:

а – after PDT;

б – without PDT

## Заключение

Проведенные исследования поглощения и спектрально-флуоресцентных свойств ФС на основе циклодекстрированной дисперсии КБХ в зависимости от его состава позволяют рекомендовать для уменьшения агрегации содержание Твин-80, равное 0,1%, а массовое отношение КБХ : циклодекстрин около 1:200.

При изучении фармакокинетики и биораспределения КБХ в органах и тканях мышей установлено, что он быстро выводится из кровотока мышей (более 70% выводится за 2 ч, 95% – за 1 сут, более 99% – за 6 сут). КБХ накапливается и удерживается в значительной концентрации в печени и почках в течение 24 ч (его содержание в этих органах через 24 ч составляет 40% и 45%

от максимальных значений, соответственно); за 6 сут из этих органов выводится более 99%. Это позволяет предположить, что основные пути элиминирования КБХ из организма мышей проходят через почки и печень.

В коже и мышцах через 24 ч после введения концентрация КБХ составляет 22% и 34% от максимальных значений, соответственно, а через 6 сут – около 2%. Обнаружено, что в тканях, в частности, в коже и мышцах, через 24 ч наблюдается частичная агрегация КБХ. Это позволяет предположить, что уменьшение интенсивности флуоресценции КБХ через 24 и более часа связано не только с его элиминацией из организма, но и с агрегацией.

Спектрально-флуоресцентные исследования показали, что КБХ селективно накапливается в инфицированных

ранах, флуоресцентная контрастность лежит в пределах 3–4. Высокие значения концентрации и селективности КБХ в инфицированных ранах достигается через 1,5–3 ч после внутривенного введения. Облучение через 2 ч после введения обеспечило высокую эффективность АФДТ инфицированных гнойных ран.

*Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках Государственного контракта № 14. N08.11.0062 по ФЦП Фарма 2020 «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу».*

## ЛИТЕРАТУРА

1. Porphyrins as antimicrobial photosensitizing agents, in Photodynamic Inactivation of Microbial Pathogens: Medical and Environmental Applications / Eds. M.R. Hamblin and G. Jori. – London, 2011.
2. Banfi S., Caruso E., Buccafurni L., et al. Antibacterial activity of tetraaryl-porphyrin photosensitizers: an in vitro study on Gram negative and Gram positive bacteria // Photochem. Photobiol. B. – 2006. – Vol. 85. – P. 28.
3. Boyle-Vavra S., Labischinski H., Ebert C.C., et al. A spectrum of changes occurs in peptidoglycan composition of glycopeptide-intermediate clinical Staphylococcus aureus isolates // Antimicrob Agents Chemother. – 2001. – Vol. 45. – P. 280-287.
4. Roland K.L., Esther C.R., Spitznagel J.K. Isolation and characterization of a gene, pmrD, from Salmonella typhimurium that confers resistance to polymyxin when expressed in multiple copies // Bacteriol. – 1994. – Vol. 176. – P. 589-597.
5. Harder K.J., Nikaido H., Matsuhashi M. Mutants of Escherichia coli that are resistant to certain beta-lactam compounds lack the ompF porin // Antimicrob Agents Chemother. – 1981. – Vol. 20. – P. 549-552.
6. Park Y.S., Lee H.B., Chin S., et al. Acquisition of extensive drug-resistant Pseudomonas aeruginosa among hospitalized patients: risk factors and resistance mechanisms to carbapenems // Hosp. Infect. – 2011. – Vol. 79. – P. 54.
7. Wainwright M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy // Antimicrob Chemother. – 1998. – Vol. 42. – P. 13-28.
8. Friedrich C.L., Moyles D., Beveridge T.J., Hancock R.E. Antibacterial action of structurally diverse cationic peptides on Gram-positive bacteria // Antimicrob Agents Chemother. – 2000. – Vol. 44. – P. 2086-2092.
9. Nikaido H. Prevention of drug access to bacterial targets: Permeability barrier and active efflux // Science. – 1994. – Vol. 264. – P. 362-368.
10. Leive L. The barrier function of the Gram-negative envelope // Ann NY Acad Sci. – 1974. – Vol. 235. – P. 109-129.
11. Bertoloni G., Rossi F., Valduga G., et al. Photosensitising activity of water- and lipid-soluble phthalocyanines on prokaryotic and eukaryotic microbial cells // Microbios. – 1992. – Vol. 71. – P. 33-46.
12. Nakonieczna J., Michta E., Rybicka M., et al. Superoxide dismutase is upregulated in Staphylococcus aureus following protoporphyrin-mediated photodynamic inactivation and does not directly influence the response to photodynamic treatment // BMC Microbiol. – 2010. – Vol. 10. – P. 323.

## REFERENCES

1. Porphyrins as antimicrobial photosensitizing agents, in Photodynamic Inactivation of Microbial Pathogens: Medical and Environmental Applications, by eds M.R. Hamblin and G. Jori. London, 2011.
2. Banfi S., Caruso E., Buccafurni L., Battini V., Zazzaron S., Orlandi V. Antibacterial activity of tetraaryl-porphyrin photosensitizers: an in vitro study on Gram negative and Gram positive bacteria, Photochem. Photobiol. B., 2006, Vol. 85, p. 28.
3. Boyle-Vavra S., Labischinski H., Ebert C.C., Ehler K., Daum R.S. A spectrum of changes occurs in peptidoglycan composition of glycopeptide-intermediate clinical Staphylococcus aureus isolates, Antimicrob Agents Chemother., 2001, Vol. 45, pp. 280-287.
4. Roland K.L., Esther C.R., Spitznagel J.K. Isolation and characterization of a gene, pmrD, from Salmonella typhimurium that confers resistance to polymyxin when expressed in multiple copies, Bacteriol., 1994, Vol. 176, pp. 589-597.
5. Harder K.J., Nikaido H., Matsuhashi M. Mutants of Escherichia coli that are resistant to certain beta-lactam compounds lack the ompF porin, Antimicrob Agents Chemother, 1981, Vol. 20, pp. 549-552.
6. Park Y.S., Lee H.B., Chin S., Han S.H., Hong S.G., Hong S.K., Kim H.Y., Uh Y., Shin H.B., Choo E.J., Han S.H., Song W., Jeong S.H., Lee K., Kim J.M. Acquisition of extensive drug-resistant Pseudomonas aeruginosa among hospitalized patients: risk factors and resistance mechanisms to carbapenems, Hosp. Infect., 2011, Vol. 79, p. 54.
7. Wainwright M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy // Antimicrob Chemother, 1998, Vol. 42, pp. 13-28.
8. Friedrich C.L., Moyles D., Beveridge T.J., Hancock R.E. Antibacterial action of structurally diverse cationic peptides on Gram-positive bacteria, Antimicrob Agents Chemother, 2000, Vol. 44, pp. 2086-2092.
9. Nikaido H. Prevention of drug access to bacterial targets: Permeability barrier and active efflux, Science, 1994, Vol. 264, pp. 362-368.
10. Leive L. The barrier function of the Gram-negative envelope, Ann NY Acad Sci, 1974, Vol. 235, pp. 109-129.
11. Bertoloni G., Rossi F., Valduga G., Jori G., Ali H., van Lier J.E. Photosensitising activity of water- and lipid-soluble phthalocyanines on prokaryotic and eukaryotic microbial cells, Microbios., 1992, Vol. 71, pp. 33-46.
12. Nakonieczna J., Michta E., Rybicka M., Grinholc M., Gwizdek-Wisniewska A., Bielawski K.P. Superoxide dismutase is upregulated in Staphylococcus aureus following protoporphyrin-mediated photodynamic inactivation and does not directly influence the response to photodynamic treatment, BMC Microbiol., 2010, Vol. 10, p. 323.

13. Tavares A., Carvalho C.M.B., Faustino M.A., et al. Antimicrobial photodynamic therapy: study of bacterial recovery viability and potential development of resistance after treatment // *Mar. Drugs*. – 2010. – Vol. 8. – P. 91.
14. Caminos D.A., Spesia M.B., Pons P., Durantini E.N. Mechanisms of *Escherichia coli* photodynamic inactivation by an amphiphilic tricationic porphyrin and 5,10,15,20-tetra(4-N,N,N trimethylammoniumphenyl) porphyrin // *Photochem. Photobiol. Sci.* – 2008. – Vol. 7. – P. 1071.
15. Hamblin M.R., Hasan T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease // *Photochem. Photobiol. Sci.* – 2004. – Vol. 3. – P. 436.
16. Wardlaw J.L., Sullivan T.J., Lux C.N., Austin F.W. Photodynamic therapy against common bacteria causing wound and skin infections // *Vet.* – 2012. – Vol. 192. – P. 374.
17. Malik Z., Ladan H., Nitzan Y. Photodynamic inactivation of Gram-negative bacteria: problems and possible solutions // *Photochem Photobiol B.* – 1992. – Vol. 14. – P. 262-266.
18. Dai T., Huang Y.Y., Hamblin M.R. Photodynamic therapy for localized infections — state of the art // *Photodiagn Photodyn Ther.* – 2009. – Vol. 6. – P. 170-188.
19. Vera D.M., Haynes M.H., Ball A.R., et al. Strategies to potentiate antimicrobial photoinactivation by overcoming resistant phenotypes // *Photochem Photobiol.* – 2012. – Vol. 88. – P. 499-511.
20. Maisch T. Resistance in antimicrobial photodynamic inactivation of bacteria // *Photochem Photobiol Sci.* – 2015. – Vol. 14. – P. 1518-1526.
21. Giuliani F., Martinelli M., Cocchi A., et al. In vitro resistance selection studies of RLP068/Cl, a new Zn(II) phthalocyanine suitable for antimicrobial photodynamic therapy // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2010. – Vol. 54. – P. 637-642.
22. de Melo W.C., Avci P., de Oliveira M.N., et al. Photodynamic inactivation of biofilm: taking a lightly colored approach to stubborn infection // *Expert Rev Anti Infect Ther.* – 2013. – Vol. 11. – P. 669-693.
23. Ferreyra D.D., Reynoso E., Cordero P., et al. Synthesis and properties of 5,10,15,20-tetrakis[4-(3-N,N-dimethylaminopropoxy)phenyl] chlorin as potential broad-spectrum antimicrobial photosensitizers // *Photochem Photobiol B.* – 2016. – Vol. 158. – P. 243-251.
24. Gad F., Zahra T., Francis K.P., et al. Targeted photodynamic therapy of established soft-tissue infections in mice // *Photochem Photobiol Sci.* – 2004. – Vol. 3. – P. 451-458.
25. Брусов С.С., Тиганова И.Г., Романова Ю.М. и др. Способ фотодинамической терапии локальных очагов инфекции // Патент России № 2610566. – 2017.
26. Ermolaeva S.A., Varfolomeev A.F., Chernukha M.Yu., et al. Bactericidal effects of non-thermal argon plasma in vitro, in biofilms and the animal model of infected wounds. // *J.Med. Microbiol.* – 2011. – Vol. 60 (Pt.1) – P.75-83.
27. Tayana M.T., Gustavo B., Bruno H.V. Aggregation of aluminum phthalocyanine hydroxide in water/ethanol mixtures // *J. Braz. Chem. Soc.* – 2014. – Vol. 25(5). – P. 890-897.
28. Ластовой А.П., Авраменко Г.В. Спектрально-люминесцентные свойства замещенных тетраазхлоринов, солюбилизованных в растворах неионогенных поверхностно-активных веществ // *Макрогетероциклы.* – 2013. – Т. 2, № 2. – С. 137-143.
29. Dhami S., De Mello A. J., Rumbles G., et al. Phthalocyanine fluorescence at high concentration: dimers or reabsorption effect? // *Photochemistry and Photobiology.* – 1995. – Vol. 61(4). – P. 341-346.
13. Tavares A., Carvalho C.M.B., Faustino M.A., Neves M.G., Tomé J.P., Tomé A.C., Cavaleiro J.A., Cunha A., Gomes N.C., Alves E., Almeida A. Antimicrobial photodynamic therapy: study of bacterial recovery viability and potential development of resistance after treatment, *Mar. Drugs*, 2010, Vol. 8, p. 91.
14. Caminos D.A., Spesia M.B., Pons P., Durantini E.N. Mechanisms of *Escherichia coli* photodynamic inactivation by an amphiphilic tricationic porphyrin and 5,10,15,20-tetra(4-N,N,N trimethylammoniumphenyl) porphyrin, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2008, Vol. 7, pp. 1071.
15. Hamblin M.R., Hasan T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2004, Vol. 3, p. 436.
16. Wardlaw J.L., Sullivan T.J., Lux C.N., Austin F.W. Photodynamic therapy against common bacteria causing wound and skin infections, *Vet.*, 2012, Vol. 192, p. 374.
17. Malik Z., Ladan H., Nitzan Y. Photodynamic inactivation of Gram-negative bacteria: problems and possible solutions, *Photochem Photobiol B*, 1992, Vol. 14, pp. 262-266.
18. Dai T., Huang Y.Y., Hamblin M.R. Photodynamic therapy for localized infections — state of the art, *Photodiagn Photodyn Ther*, 2009, Vol. 6, pp. 170-188.
19. Vera D.M., Haynes M.H., Ball A.R., Dai T., Astrakas C., Kelso M.J., Hamblin M.R., Tegos G.P. Strategies to potentiate antimicrobial photoinactivation by overcoming resistant phenotypes, *Photochem Photobiol*, 2012, Vol. 88, pp. 499-511.
20. Maisch T. Resistance in antimicrobial photodynamic inactivation of bacteria, *Photochem Photobiol Sci*, 2015, Vol. 14, pp. 1518-1526.
21. Giuliani F., Martinelli M., Cocchi A., Arbia D., Fantetti L., Roncucci G. In vitro resistance selection studies of RLP068/Cl, a new Zn(II) phthalocyanine suitable for antimicrobial photodynamic therapy, *Antimicrob Agents Chemother*, 2010, Vol. 54, pp. 637-642.
22. de Melo W.C., Avci P., de Oliveira M.N., Gupta A., Vecchio D., Sadasivam M., Chandran R., Huang Y.Y., Yin R., Perussi L.R., Tegos G.P., Perussi J.R., Dai T., Hamblin M.R. Photodynamic inactivation of biofilm: taking a lightly colored approach to stubborn infection, *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2013, Vol. 11, pp. 669-693.
23. Ferreyra D.D., Reynoso E., Cordero P., Spesia M., Alvarez M.G., Milanesio M.E., Durantini E. Synthesis and properties of 5,10,15,20-tetrakis[4-(3-N,N-dimethylaminopropoxy)phenyl] chlorin as potential broad-spectrum antimicrobial photosensitizers, *Photochem Photobiol B*, 2016, Vol. 158, pp. 243-251.
24. Gad F., Zahra T., Francis K.P., Hasan T., Hamblin M.R. Targeted photodynamic therapy of established soft-tissue infections in mice, *Photochem Photobiol Sci.*, 2004, Vol. 3, pp. 451-458.
25. Brusov S.S., Tiganova I.G., Romanova Yu.M., Grin M.A., Meerovich G.A. The process of photodynamic therapy for local foci of infection, Patent RF No. 2610566, 2017.
26. Ermolaeva S.A., Varfolomeev A.F., Chernukha M.Yu., et al. Bactericidal effects of non-thermal argon plasma in vitro, in biofilms and the animal model of infected wounds, *J.Med. Microbiol.*, 2011, Vol. 60 (Pt.1), pp.75-83.
27. Tayana M.T., Gustavo B., Bruno H.V. Aggregation of aluminum phthalocyanine hydroxide in water/ethanol mixtures, *J. Braz. Chem. Soc.*, 2014, Vol. 25(5), pp. 890-897.
28. Lastovoi A.P., Avramenko G.V. Spectral-Luminescent Properties of the Substituted Tetraazachlorins Solubilized in Solutions of Nonionic Surfactants, *Makrogeterotsikly*, 2013, Vol. 2, No. 2, pp. 137-143.
29. Dhami S., De Mello A.J., Rumbles G., Bishop S.M., Philips D., Beeby A. Phthalocyanine fluorescence at high concentration: dimers or reabsorption effect? *Photochemistry and Photobiology*, 1995, Vol. 61(4), pp. 341-346.