

ФОТОДИНАМИЧЕСКАЯ ИНАКТИВАЦИЯ ПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ В БИОПЛЕНКАХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НОВЫХ СИНТЕТИЧЕСКИХ ПРОИЗВОДНЫХ БАКТЕРИОХЛОРИНА

И.Г. Тиганова¹, Е.А. Макарова², Г.А. Меерович^{3,4}, Н.В. Алексеева¹, Э.Р. Толордава¹, Ю.С. Жижимова¹, Е.А. Лукьянец², Ю.М. Романова^{1,5}

¹Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного акад. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия

²ФГУП ГНЦ «НИОПИК», Москва, Россия

³Институт общей физики имени А.М. Прохорова РАН, Москва, Россия

⁴Национальный исследовательский ядерный университет МИФИ, Москва, Россия

⁵Первый Московский Государственный Медицинский Университет им. И.М. Сеченова, Москва, Россия

Резюме

Производные бактериохлорина, как антимикробные фотосенсибилизаторы, имеют серьезные перспективы в связи с растущей множественной антибиотикорезистентностью бактерий. В работе было изучено *in vitro* влияние количества положительно заряженных заместителей и липофильности молекулы синтетических производных бактериохлорина на эффективность фотодинамической инактивации бактерий в биопленках с целью определить оптимальное соотношение этих параметров. Были исследованы четыре синтетических производных бактериохлорина, синтезированные во ФГУП «ГНЦ «НИОПИК»: гидрофобный нейтральный мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорин (BC1), амфифильный тетракатийный мезо-тетра(1-ундецил-3-пиридил)бактериохлорин тетрабромид (BC2), гидрофильные тетракатийный мезо-тетра[1-(4'-бромбутил)-3-пиридил]бактериохлорин тетрабромид (BC3) и октакатийный мезо-тетра[1-(4'-пиридинобутил)-3-пиридил]бактериохлорин октабромид (BC4). Наибольшую эффективность в фотоинактивации бактерий в биопленках показали водорастворимые катионные производные бактериохлорина. Полную гибель бактерий в биопленках (99,999% и более) вызывали для *S. aureus* 15 тетракатийный BC3, а для *P. aeruginosa* 32 октакатийный BC4. В отношении грамотрицательных бактерий в биопленках увеличение числа катионных групп у фотосенсибилизатора от 4 до 8 усиливало бактерицидное действие. Отсутствие заряда и высокая липофильность молекулы фотосенсибилизатора оказывали негативное влияние на фотодинамическую инактивацию бактерий в биопленках. Проведенные эксперименты показали, что одним из механизмов бактерицидного действия фотосенсибилизаторов может быть разрушение мембран бактерий в результате фотодинамического воздействия.

Ключевые слова: биопленки бактерий, фотосенсибилизатор, фотодинамическая инактивация, бактериохлорин.

Для цитирования: Тиганова И.Г., Макарова Е.А., Меерович Г.А., Алексеева Н.В., Толордава Э.Р., Жижимова Ю.С., Лукьянец Е.А., Романова Ю.М. Фотодинамическая инактивация патогенных бактерий в биопленках с использованием новых синтетических производных бактериохлорина // Biomedical Photonics. – 2017. – Т. 6, № 4. – С. 27-36.

Контакты: Тиганова И. Г., e-mail: iraida1tig@mail.ru

PHOTODYNAMIC INACTIVATION OF PATHOGENIC BACTERIA IN BIOFILMS USING NEW SYNTHETIC BACTERIOCHLORIN DERIVATIVES

Tiganova I.G.¹, Makarova E.A.², Meerovich G.A.^{3,4}, Alekseeva N.V.¹, Tolordava E.R.¹, Zhizhimova Yu.S.¹, Lukanets E.A.², Romanova Yu.M.^{1,5}

¹N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia

²Organic Intermediates and Dyes Institute, Moscow, Russia

³A.M. Prokhorov General Physics Institute of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

⁴National research nuclear university MPhI, Moscow, Russia

⁵I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

Abstract

Bacteriochlorins as the antimicrobial photosensitizers have a promising future in the face of the unrelenting increase in antimicrobial resistance. The goal of this study was to investigate the influence of lipophilicity and number of positively charged substituents in these molecules on the photodynamic inactivation (PDI) of biofilm bacteria *in vitro*. Testing how bacteriochlorin derivatives with different properties affect microbes will allow to determine the optimal ratio of these parameters within a single molecule.

We have investigated 4 bacteriochlorin derivatives, all of which were synthesized in Organic Intermediates and Dyes Institute. These were: hydrophobic neutral meso-tetra(3-pyridyl) bacteriochlorin (BC1), amphiphilic tetracationic meso-tetra(1-undecyl-3-pyridyl)bacteriochlorin tetrabromide (BC2), hydrophilic tetracationic meso-tetra[1-(4'-bromobutyl)-3-pyridyl]bacteriochlorin tetrabromide (BC3) and octacationic meso-tetra[1-(4'-pyridinobutyl)-3-pyridyl]bacteriochlorin octabromide (BC4). The water-soluble cationic bacteriochlorin derivatives showed the most effective PDI of bacteria in biofilms. While tetracationic BC3 caused total inactivation of *S. aureus* 15, octacationic BC4 was bactericidal for *P. aeruginosa* 32 to the same degree (>99.999%). Interestingly, increasing the number of cationic substituents from 4 to 8 in bacteriochlorin molecules enhances bactericidal action against gram-negative bacteria in biofilms. The lack of charge-carrying groups and high degree of lipophilicity of PS have negative impact on PDI of biofilm bacteria. Bacterial membrane damage as a result of PDI can be one of the causes of cell death.

Key words: bacterial biofilms, photosensitizer, photodynamic inactivation, bacteriochlorin.

For citations: Tiganova I.G., Makarova E.A., Meerovich G.A., Alekseeva N.V., Tolordava E.R., Zhizhimova Yu.S., Lukyanets E.A., Romanova Yu.M. Photodynamic inactivation of pathogenic bacteria in biofilms using new synthetic bacteriochlorin derivatives, *Biomedical Photonics*, 2017, T. 6, No. 4, pp. 27-36 (in Russian).

Contacts: Tiganova I.G., e-mail: iraida1tig@mail.ru

Введение

Все более широкое распространение множественной резистентности к антибиотикам и дезинфектантам среди патогенных бактерий заставляет искать альтернативные способы борьбы с инфекциями. В последние годы большое внимание исследователей привлекает метод антимикробной фотодинамической терапии (АФДТ). Метод основан на использовании фотосенсибилизаторов (ФС), которые вводят в организм пациента и активируют световым излучением. Под действием энергии света происходит фотохимическая реакция с образованием синглетного кислорода и свободных радикалов, которые приводят к гибели бактерий, накопивших ФС. Преимущество АФДТ состоит в том, что она, в отличие от антибиотикотерапии, не приводит к возникновению резистентности у бактерий. АФДТ перспективна в отношении локальных очагов инфекции, таких как инфицированные раны, тонзиллиты, синуситы, пародонтоз и др. При всех этих заболеваниях патогенные микроорганизмы формируют биопленки – сообщества одного или нескольких видов, прикрепленные к какой-либо поверхности и покрытые полимерным матриксом, который они продуцируют. Бактерии в биопленках обладают повышенной устойчивостью не только к антибиотикам и дезинфектантам, что затрудняет их лечение традиционными методами, но и к АФДТ. Факторами, способными снизить эффективность АФДТ, могут быть условия гипоксии в биопленке, а также то, что полимеры матрикса могут связывать активные формы кислорода, которые образуются при фотохимической реакции, и, возможно, сами молекулы ФС, которые не достигают бактерий. В связи с этим актуальным является поиск оптимальной химической структуры ФС для фотодинамической инактивации бактерий в биопленках.

Известно, что против грамположительных бактерий могут быть эффективны анионные, нейтральные и катионные ФС, в то время как против грамотрицательных бактерий эффективны только катионные. Грамотрицательные бактерии более устойчивы к АФДТ, это связано со строением и зарядом их клеточной стенки [1]. Как правило, в локальных очагах инфекции биопленки имеют мультивидовую природу, и часто включают грамположительные и грамотрицательные бактерии (например, *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa*), поэтому ФС широкого спектра действия должен быть катионным.

Количество и распределение катионных зарядов влияет на эффективность связывания молекул ФС с бактериями и их фотодинамическую инактивацию [2]. Исследования влияния на эффективность фотодинамической инактивации планктонных грамотрицательных бактерий количества катионных групп n_k в молекуле ФС показали, что усиление фотоинактивации бактерий при возрастании n_k от 1 до 4 достаточно велико, а при дальнейшем увеличении n_k выражено в значительно меньшей степени [3]. Частично это может быть связано и с тем, что катионные ФС в меньшей степени подвержены агрегации при высоких концентрациях, снижающей фотодинамическую эффективность [3,4].

Хотя размеры бактерий сопоставимы с длиной пробега синглетного кислорода, все же более эффективными оказываются ФС, которые могут преодолеть клеточную стенку грамотрицательных бактерий [5]. Небольшие гидрофильные и липофильные молекулы проникают внутрь грамотрицательных бактерий разными путями, и определенная амфифильность молекулы ФС может позволить молекуле преодолеть мем-

брану, следовательно, это свойство может оказаться важным при выборе эффективного ФС.

В ряде работ описаны исследования фотодинамической инактивации бактерий в биопленках *in vitro*, причем ее эффективность варьирует от 30% до 99,999% в зависимости от вида и штамма бактерий, использованного ФС, источника света и других параметров эксперимента, что говорит о необходимости дальнейших исследований в этой области [6, 7, 8]. В частности, неизвестно, как величина положительного заряда молекулы ФС влияет на фотодинамическую инактивацию бактерий в биопленках, поскольку в состав матрикса также входят заряженные макромолекулы, например, ДНК, имеющая отрицательный заряд.

В настоящей работе в качестве ФС исследовали соединения класса бактериохлоринов. Метод получения устойчивых синтетических бактериохлоринов был описан в литературе [9, 10, 11]. Синтезированные J.S. Lindsey и соавт. катионные производные бактериохлорина показали высокую антимикробную эффективность в отношении *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* и грибов рода *Candida* [12], однако синтез этих соединений оказался настолько сложным и многостадийным, что вряд ли может быть использован для получения ФС в больших количествах.

Две другие работы посвящены исследованию фотодинамической активности тетракаатионного производного мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий [13, 14]. Эти работы подтвердили перспективность использования производных бактериохлорина в качестве ФС для АФДТ. Однако в них изучали фотоинактивацию планктонных бактерий и не затрагивали биопленки, в то время как известно, что бактерии в биопленках намного (в сотни раз) более резистентны к ФДТ, чем свободноживущие (планктонные), что было показано, в частности, для *Pseudomonas aeruginosa* с использованием 5-аминолевулиновой кислоты и метиленового синего в качестве ФС [15, 16].

Синтетические производные бактериохлорина, использованные в настоящей работе, имеют максимум поглощения в ближней инфракрасной области спектра. ФС с максимумом поглощения в инфракрасной области спектра могут быть востребованы для терапии глубоких очагов инфекции, т.к. свет этого диапазона проникает на большую глубину (более 12 мм) в ткани без значительной потери энергии [17]. Это важно, например, для терапии ран, инфицированных синегнойной палочкой (*Pseudomonas aeruginosa*), поскольку эти бактерии могут распространяться на глубину до 1,5 см [18].

В работе была поставлена задача изучить влияние количества положительно заряженных заместителей и липофильности (или амфифильности) молекул синтетических производных бактериохлорина на фото-

динамическую инактивацию бактерий в биопленках *in vitro* с целью определить оптимальное соотношение этих параметров.

Материал и методы

Фотосенсибилизаторы

Были исследованы четыре синтетических производных бактериохлорина, синтезированные во ФГУП «ГНЦ «НИОПИК»:

- гидрофобный нейтральный мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорин (BC1) [19];
- амфифильный тетракаатионный мезо-тетра(1-ундецил-3-пиридил)бактериохлорин тетрабромид (BC2);
- гидрофильный тетракаатионный мезо-тетра[1-(4'-бромбутил)-3-пиридил]бактериохлорин тетрабромид (BC3);
- гидрофильный октакаатионный мезо-тетра[1-(4'-пиридиниобутил)-3-пиридил]бактериохлорин октабромид (BC4) [20].

Синтез и характеристики BC1, а также BC3 и BC4 описаны в публикациях [19,20]. BC2 был синтезирован взаимодействием BC1 с избытком бромистого ундецила в кипящем нитрометане в течение 3 ч в инертной атмосфере с выходом 72,8%. Электронный спектр поглощения, $\lambda_{\text{макс}}$, нм (lg ϵ), метанол: 349 (4,89), 373 (4,87), 428 (4,07), 515 (4,65), 760 (4,97). Спектр ЯМР ^1H (DMSO- d_6), δ , м.д.: -1,21 (с, 2H, NH), 0,82 (т, 12H, CH₃), 1,22 – 1,40 (м, 64H, CH₂), 2,08 – 2,13 (м, 8H, CH₂), 4,02 – 4,12 (м, 4H, β -H), 4,86 (ш, 8H, CH₂), 8,24 (с, 4H, β -H), 8,55 (т, 4H, H-5 (Py)), 9,14 – 9,17 (м, 4H, H-6 (Py)), 9,52 (д, 4H, H-4 (Py)), 9,83 – 9,87 (м, 4H, H-2 (Py)). Найдено, %: C 64,27, 64,37; H 8,11, 8,07; N 7,24, 7,30. C₈₄H₁₂₂Br₄N₈. Вычислено, %: C 64,53; H 7,86; N 7,17. Химическое строение изучаемых производных бактериохлорина изображено на рис. 1.

BC1 и BC2 использовали в виде водной дисперсии в 8%-ом и 4%-ом Кремофоре ELP (BASF), а тетра- и октакаатионные ФС BC3 и BC4 растворяли в дистиллированной воде.

Все эти соединения поглощают в ближней инфракрасной области спектра: BC1 имеет максимум поглощения при $\lambda=747$ нм, остальные – при $\lambda=760$ нм.

Бактерии

Исследования проводили на клинических изолятах *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa*, которые часто являются этиологическими агентами заболеваний, ассоциированных с биопленками. Бактерии выращивали в питательном бульоне LB или на 1% агаре LB (Difco, США).

Источники света

В качестве источников света использовали галогеновую лампу с ситалловым фильтром, пропускающим длины волн от 600 до 850 нм, а также светодиодный

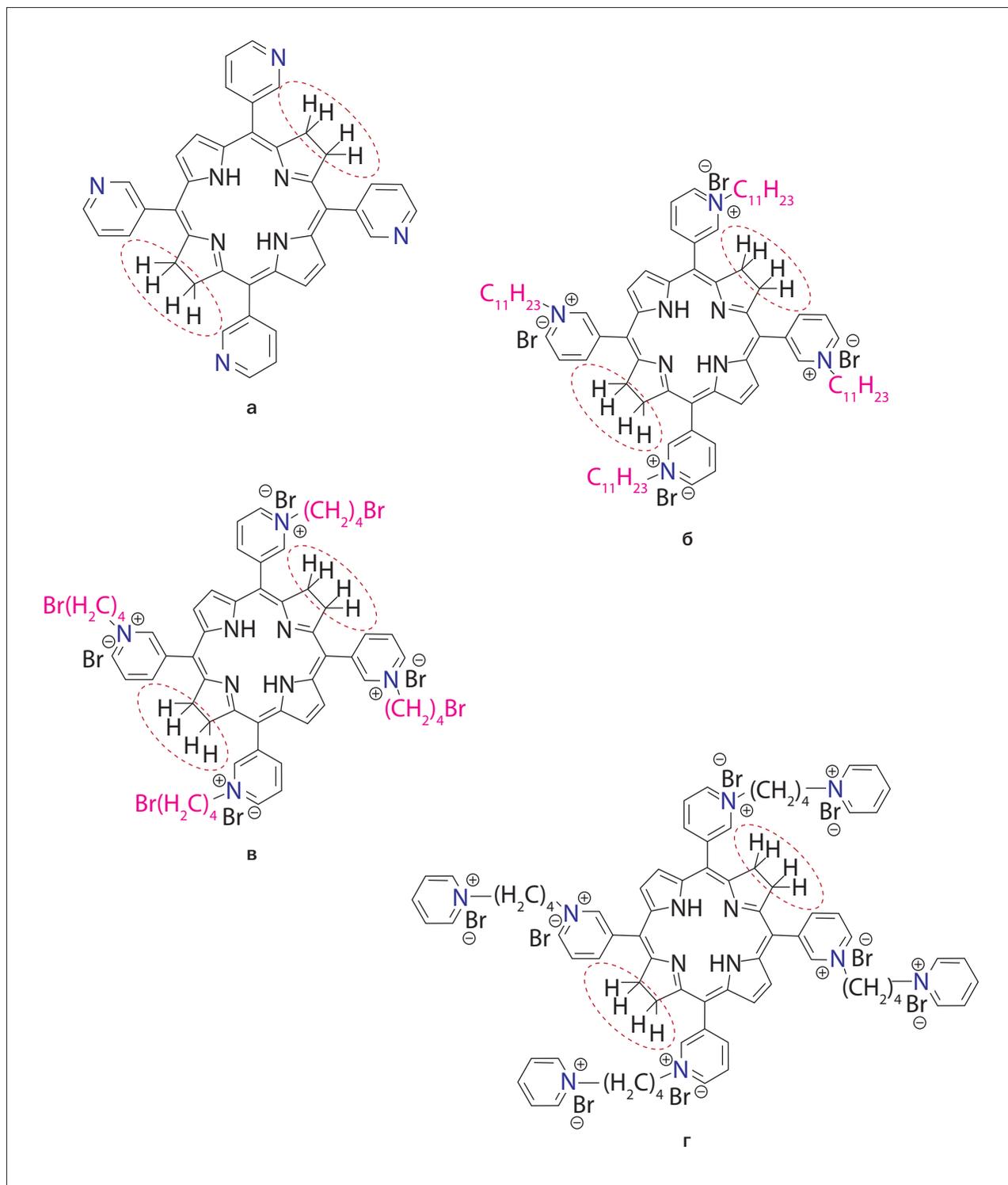


Рис. 1. Химические формулы изучаемых ФС:

- а – гидрофобный нейтральный мезо-тетра(3-пиридил) бактериохлорин (BC1);
- б – амфифильный тетракаатионный мезо-тетра(1-ундецил-3-пиридил) бактериохлорин тетрабромид (BC2);
- в – гидрофильный тетракаатионный мезо-тетра[1-(4'-бромбутил)-3-пиридил] бактериохлорин тетрабромид (BC3);
- г – гидрофильный октакаатионный мезо-тетра[1-(4'-пиридиониобутил)-3-пиридил] бактериохлорин октабромид (BC4)

Fig. 1. Chemical structure of PS in study:

- a – hydrophobic neutral meso-tetra(3-pyridyl) bacteriochlorin (BC1);
- б – amphiphilic tetracationic meso-tetra(1-undecyl-3-pyridyl)bacteriochlorin tetrabromide (BC2);
- в – hydrophilic tetracationic meso-tetra[1-(4'-bromobutyl)-3-pyridyl]bacteriochlorin tetrabromide (BC3);
- г – hydrophilic octacationic meso-tetra[1-(4'-pyridiniobutyl)-3-pyridyl]bacteriochlorin octabromide (BC4)

источник с длиной волны спектрального максимума излучения 760 нм. Плотность мощности контролировали с помощью измерителя мощности «Coherent labmax» («Coherent», США), и она составляла для галогеновой лампы 6 мВт/см², а для светодиодного источника – 20 мВт/см².

Фотодинамическая инактивация планктонных бактерий

Для планктонных культур определяли минимальную бактерицидную концентрацию (МБК) ФС в стандартных условиях: инкубация бактерий с ФС 30 мин, плотность энергии 30 Дж/см². Исходный титр бактерий – 1×10^8 КОЕ/мл. Использовали двукратные разведения ФС, начиная с 100 мкМ, а для ВС1 – с 1 мМ. После инкубации бактериальную суспензию центрифугировали, ФС удаляли, бактерии ресуспендировали в физиологическом растворе и разливали по 100 мкл из каждой концентрации и контроля без ФС в лунки двух 96-луночных плоскодонных планшетов: 1 – для последующего облучения, 2 – необлучаемый контроль.

После облучения 50 мкл суспензии из каждой лунки высевали на чашки Петри с LB агаром, инкубировали в темноте при 37°C в течение 20 ч. Отмечали наименьшую концентрацию ФС, высев из которой не давал роста. Эту концентрацию принимали за МБК.

Фотодинамическая инактивация бактерий в биопленках

Биопленки бактерий выращивали 18 ч на стеклянных пластинках 7x12 мм в чашке Петри, в которую наливали LB бульон с засеянной культурой бактерий. Затем стекла переносили в 24-луночный планшет, промывали дистиллированной водой, заливали растворами ФС различной концентрации, инкубировали 1 ч в термостате при 37°C, ФС удаляли и стекла помещали в физиологический раствор и облучали. После облучения стекла и жидкость из лунки переносили в пробирку Эппендорф, биопленку снимали зондом-щеточкой и вместе со щеточкой обрабатывали 10 мин на Вортексе. Микроскопический контроль показал, что конгломератов бактерий после такой обработки очень мало, в основном видны одиночные бактерии. 10-кратные разведения суспензии бактерий высевали на чашки с LB агаром для подсчета колоний и определения титра КОЕ.

Окраска биопленок Live/Dead Biofilm Viability Kit

Биопленку бактерий выращивали на покровных стеклах в чашках Петри диаметром 35 мм в течение 3 ч при 37°C. Затем жидкость отбирали и вносили в чашку 800 мкл раствора ФС в концентрации 200 мкМ, в контроль – 800 мкл дистиллированной воды. После 1 ч инкубации при 37°C в темноте растворы отбирали, стекла с биопленками помещали в 1,5 мл воды и облучали световым излучением с плотностью энер-

гии 70 Дж/см². Необлученный контроль в это время инкубировали в темноте. После облучения стекла тщательно промывали дистиллированной водой и окрашивали 15 мин раствором красителя Live/Dead Biofilm Viability Kit согласно инструкции. Стекла анализировали в световом микроскопе Nikon H600L (Eclipse Ni) (Япония) с флуоресцентным объективом.

Результаты и обсуждение

Фотодинамическая инактивация планктонных бактерий

Биологическую активность ФС исследовали на планктонных культурах патогенных бактерий: грамположительных *S. aureus* 15 и грамотрицательных *P. aeruginosa* 32. Определение МБК ФС для стандартных условий (инкубация бактерий с ФС 30 мин, плотность дозы световой энергии 30 Дж/см²) показало, что нейтральный ВС1 неэффективен до концентрации 1 мМ в отношении планктонных бактерий как *S.aureus*, так и *P.aeruginosa*. Наибольшей активностью обладают заряженные водорастворимые ВС3 и ВС4, близкой к ним активностью обладает амфифильный ВС2 (табл.).

Фотодинамическая инактивация бактерий в биопленках

При облучении излучением галогеновой лампы с фильтром, формирующим полосу с равномерной спектральной плотностью в диапазоне 650-850 нм, было проведено фотодинамическое воздействие на биопленки всех четырех ФС в одном опыте. Определение титра КОЕ после фотодинамического воздействия на биопленки показало, что в отношении биопленок *S. aureus* наибольшей активностью обладает тетракатинный водорастворимый ВС3, нейтральный и амфифильный ФС малоактивны. В то же время биопленки *P. aeruginosa* наиболее чувствительны к октакатинному ВС4, остальные ФС менее активны (рис. 2, 3).

Таблица
Минимальные бактерицидные концентрации ФС для планктонных бактерий

Table
Minimal bactericidal concentrations of PS for planktonic bacteria

ФС PS	МБК (мкМ) МВС (μМ)	
	<i>S. aureus</i> 15	<i>P. aeruginosa</i> 32
BC1	1000	1000
BC2	100	25
BC3	25	6,2
BC4	50	25

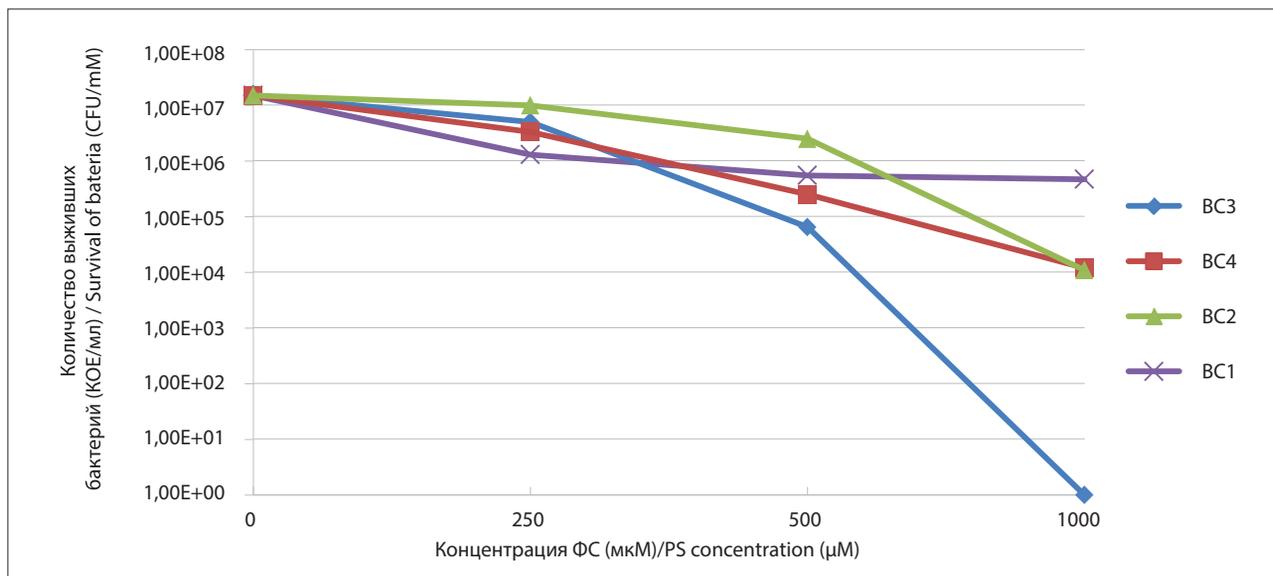


Рис. 2. Антимикробная фотодинамическая активность производных бактериохлорина в отношении *S. aureus 15* в биопленках (галогеновая лампа с фильтром 600-850 нм, экспозиция раствора ФС 1 ч, плотность энергии 70 Дж/см²)
Fig. 2. Photodynamic inactivation of *S. aureus 15* in biofilms (incubated with PS for 1 h, halogen lamp with 650-850 nm bandpass filter, light dose 70 J/cm²)

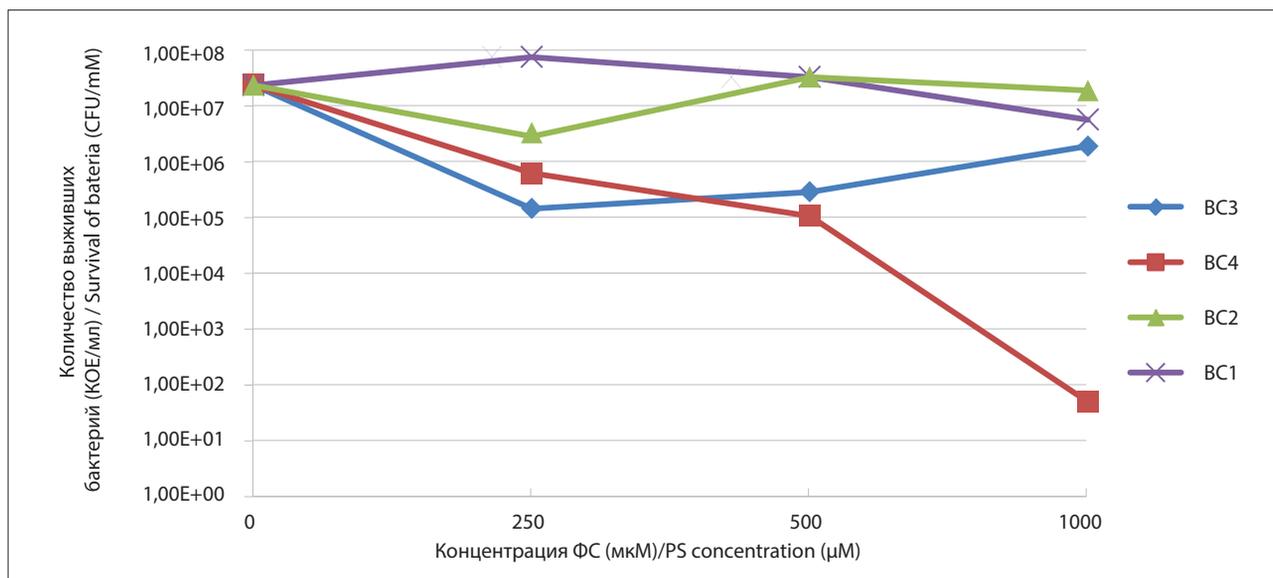


Рис. 3. Антимикробная фотодинамическая активность производных бактериохлорина в отношении *P. aeruginosa 32* в биопленках (экспозиция раствора ФС 1 ч, галогеновая лампа с фильтром 600-850 нм, плотность энергии 70 Дж/см²)
Fig. 3. Photodynamic inactivation of *P. aeruginosa 32* in biofilms (incubated with PS for 1 h, halogen lamp with 650-850 nm bandpass filter, light dose 70 J/cm²)

Поскольку BC1, имеющий пик поглощения при 747 нм, не показал антибактериальной активности в отношении биопленок, эти же опыты были повторены только для BC2, BC3 и BC4 с использованием в качестве источника света светодиодного источника с узкой полосой со спектральным максимумом около 760 нм. При таком облучении получены качественно те же результаты, что и при использовании галогеновой

лампы с фильтром, но благодаря более эффективному поглощению сенсibilизированной биопленкой монохроматического излучения с длиной волны, близкой к спектральному максимуму поглощения, при сенсibilизации BC4 в концентрации 1 мМ и облучении с плотностью энергии 70 Дж/см² удалось добиться полной инактивации бактерий *P. aeruginosa 32* в биопленках.

Полная фотодинамическая инактивация *S. aureus 15*

в биопленках наблюдалась при сенсibiliзации ВС3 в той же концентрации и при той же дозе света. Результаты одного из трех аналогичных опытов приведены на рис. 4 и 5. Инкубация биопленок с ФС без облучения не приводила к заметному снижению титра жизнеспособных бактерий (данные не приведены).

Использование флуоресцентного красителя Live/Dead Biofilm Viability Kit и флуоресцентной микроскопии позволило продемонстрировать гибель бактерий *S. aureus 15* и *P. aeruginosa 32* в составе биопленки под действием водорастворимых тетра- и октационных

ФС. Один компонент красителя, SYTO 9, окрашивает в флуоресцирующий зеленый цвет всю ДНК, другой компонент (пропидиум иодид) не проникает через целостные мембраны и окрашивает в флуоресцирующий красный цвет только ДНК мертвых клеток с поврежденными мембранами. В наших опытах использовались «молодые» биопленки, сформированные за 3 ч, они не содержат внеклеточной ДНК, которая окрашивается пропидиум иодидом, что ухудшает визуализацию бактерий. Исчезновение зеленой и появление красной окраски свидетельствует о повреждении мембран и гибели бак-

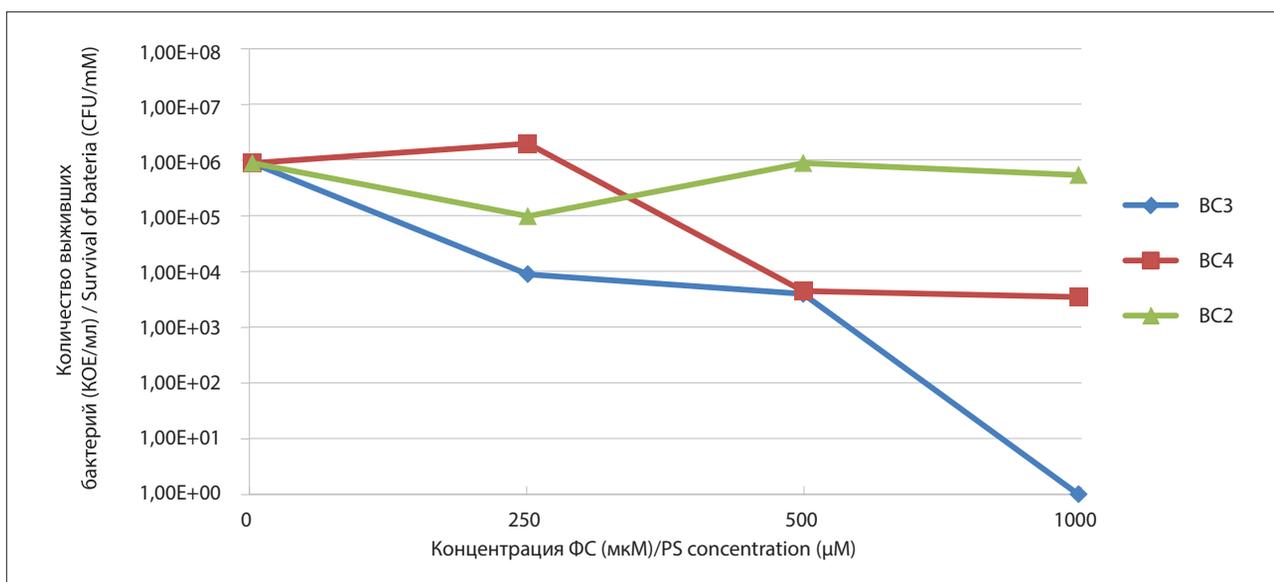


Рис. 4. Антимикробная фотодинамическая активность производных бактериохлорина в отношении *S. aureus 15* в биопленках (экспозиция раствора ФС 1 ч, светодиодный источник 760 нм, плотность энергии 70 Дж/см²)
Fig. 4. Photodynamic inactivation of *S. aureus 15* in biofilms (incubated with PS for 1 h, LED light source 760 nm, light dose 70 J/cm²)

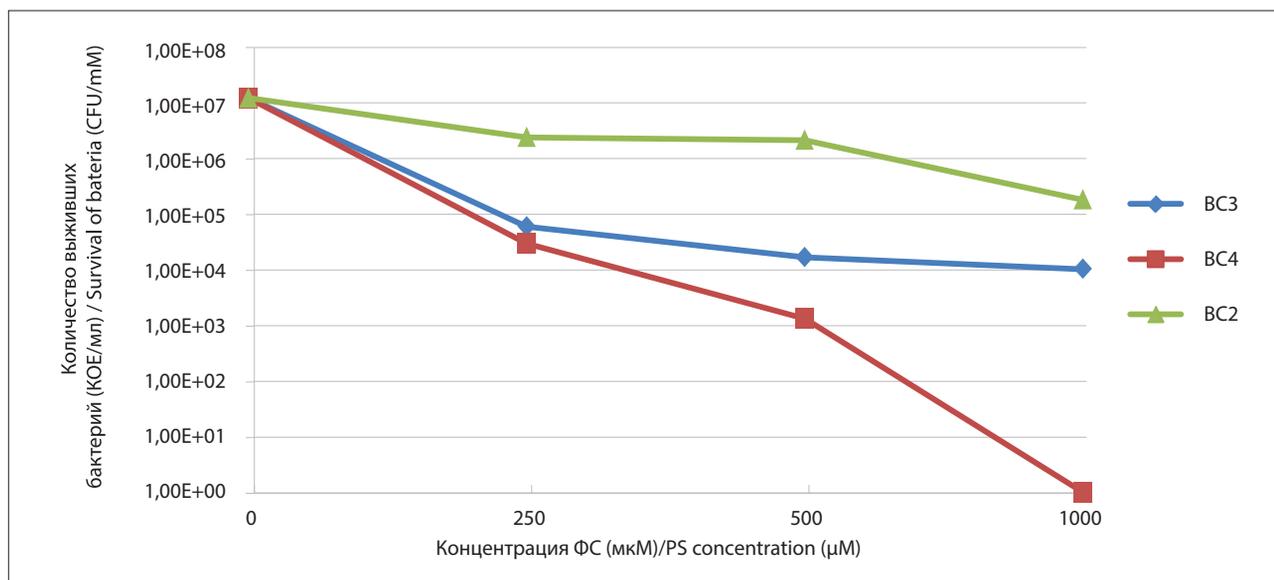


Рис. 5. Антимикробная фотодинамическая активность производных бактериохлорина в отношении *P. aeruginosa 32* в биопленках (экспозиция раствора ФС 1 ч, светодиодный источник 760 нм, плотность энергии 70 Дж/см²)
Fig. 5. Photodynamic inactivation of *P. aeruginosa 32* in biofilms (incubated with PS for 1 h, LED light source 760 nm, light dose 70 J/cm²)

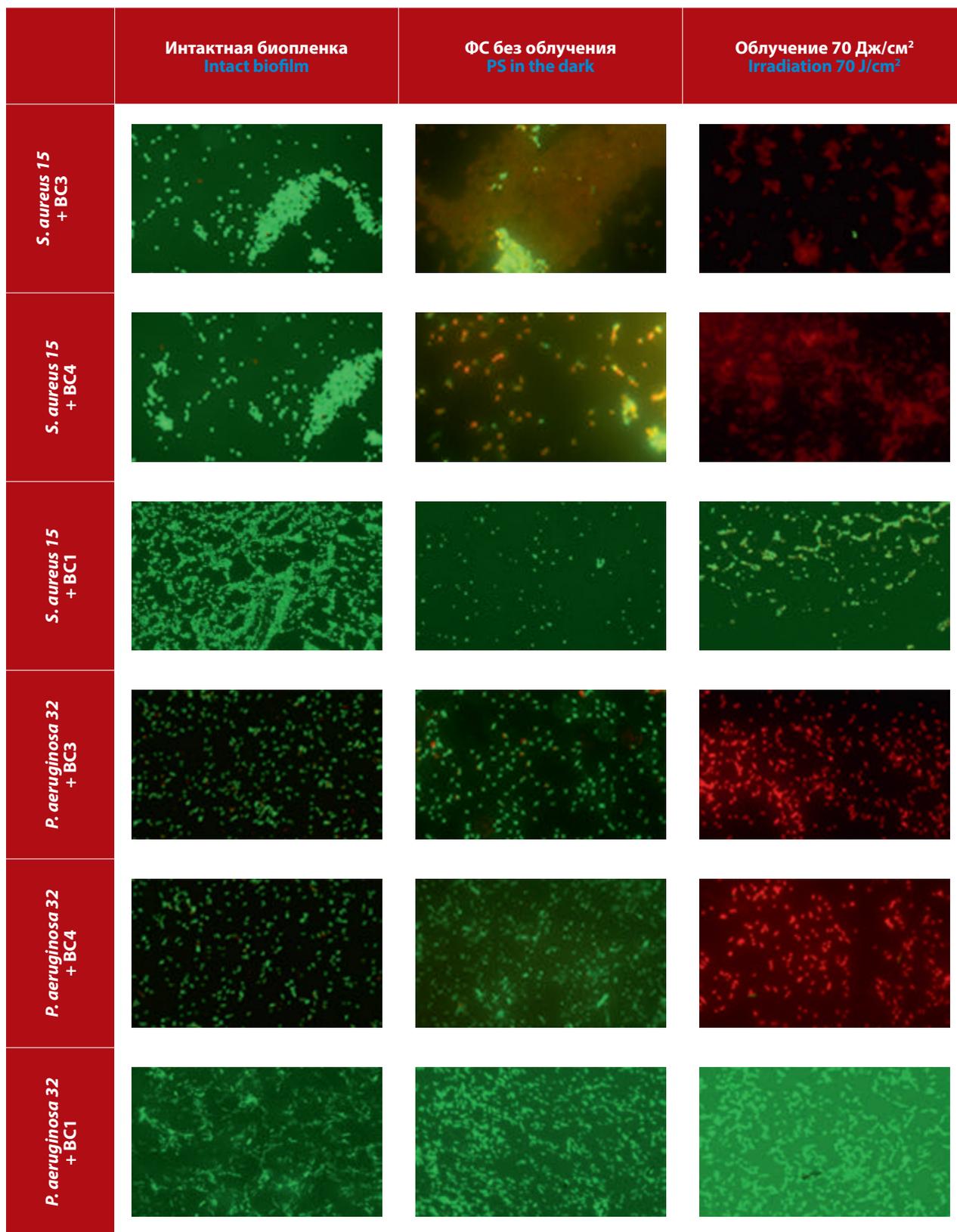


Рис. 6. Флуоресцентная микроскопия биопленок *S. aureus* 15 и *P. aeruginosa* 32 после ФДТ с BC1, BC3 и BC4 и окраски Live/Dead Biofilm Viability Kit
 Инструментальное увеличение 600x

Fig. 6. Fluorescent microscopy of *S. aureus* 15 and *P. aeruginosa* 32 biofilms after PDT with BC1, BC3 and BC4 and staining with Live/Dead Biofilm Viability Kit
 Instrumental magnification 600x

терий, что и наблюдается при воздействии ВС3 и ВС4 с облучением на биопленки *S. aureus* 15 и *P. aeruginosa* 32 (рис. 6). Отдельные красные бактерии при воздействии этих ФС без облучения являются результатом их некоторой темновой токсичности. После воздействия незаряженного ВС1 и облучения бактерии не меняли окраску, что говорит об отсутствии повреждения мембран. Таким образом, данные флуоресцентной микроскопии подтвердили результаты опытов с определением числа жизнеспособных бактерий путем посева и позволяют заключить, что, по крайней мере, один из механизмов бактерицидного действия ФС – разрушение мембран бактерий в результате фотодинамического воздействия.

Заключение

Проведенные эксперименты свидетельствуют о том, что наиболее эффективны для фотоинактивации бактерий в биопленках водорастворимые катионные ФС: тетраакатионный ВС3 в отношении *S. aureus* 15, октакатионный ВС4 – в отношении *P. aeruginosa* 32. Увеличение числа катионных групп ФС от 4 до 8 усиливает бактерицидное действие по отношению к грамотрицательным бактериям в биопленках. Отсутствие заряда и высокая липофильность молекулы ФС оказывают негативное действие на фотодинамическую инактивацию бактерий в биопленках.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 15-04-04363). Авторы выражают благодарность н.с. ФГУП «ГНЦ «НИОПИК» Дудкину С.В. за участие в синтезе ВС2.

ЛИТЕРАТУРА

1. Malik Z., Ladan H., Nitzan Y. Photodynamic inactivation of Gram-negative bacteria: problems and possible solutions // *J. Photochem. Photobiol.* – 1992. – Vol. 14. – P. 262-266.
2. Simões C., Gomes M.C., Neves M.G.P.M.S., et al. Photodynamic inactivation of *Escherichia coli* with cationic meso-tetraarylporphyrins – The charge number and charge distribution effects // *Catalysis Today.* – 2016. – Vol. 266. – P. 197-204.
3. Страховская М.Г., Антоненко Ю.Н., Пашковская А.А. и др. Электростатическое связывание замещенных металлофталоцианинов с клетками энтеробактерий: роль в фотодинамической инактивации // *Биохимия.* – 2009. – Т. 74, Вып. 12. – С. 1603-1614.
4. Meerovich G.A., Tiganova I.G., Makarova E.A., et al. Photodynamic inactivation of bacteria and biofilms using cationic bacteriochlorins // *J. of Physics: Conference Series.* – 2016. – Vol. 691. doi: 10.1088/1742-6596/691/1/012011
5. Usacheva M.N., Teichert M.C., Biel M.A. Comparison of the methylene blue and toluidine blue photobactericidal efficacy against gram-positive and gram-negative microorganisms // *Lasers Surg. Med.* – 2001. – Vol. 29(2). – P. 165-173.
6. Li X., Guo H., Tian Q., et al. Effects of 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy on antibiotic-resistant staphylococcal biofilm: an *in vitro* study // *J.Surg.Res.* – 2013. – Vol. 184. – P.1013-1021.
7. Wang Y., Zhou Q., Wang Y., et al. In vitro photodynamic inactivation effects of Ru(II) complexes on clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* planktonic and biofilm cultures // *Photochem. Photobiol.* – 2015. – Vol. 91. – P. 124-133.
8. Cieplik F., Späth A., Regensburger J., et al. Photodynamic biofilm inactivation by SAPYR – an exclusive singlet oxygen photosensitizer // *Free Radical Biology and Medicine.* – 2013. – Vol. 65. – P. 477-487.
9. Kim H.-J., Lindsey J.S. De novo synthesis of stable tetrahydroporphyrinic heterocycles: bacteriochlorins and a tetrahydrocorrin // *J. Org. Chem.* – 2005. – Vol. 70. – P. 5475-5486.
10. Krayer M., Ptaszek M., Kim H.J., et al. Expanded scope of synthetic bacteriochlorins via improved acid catalysis conditions and diverse dihydrodipyrin-acetals // *J. Org. Chem.* – 2010. – Vol. 75. – P. 1016-1039.
11. Mass O., Lindsey J.S. A trans-AB-bacteriochlorin building block // *J. Org. Chem.* – 2011. – Vol. 76. – P. 9478-9487.

REFERENCES

1. Malik Z., Ladan H., Nitzan Y. Photodynamic inactivation of Gram-negative bacteria: problems and possible solutions, *J. Photochem. Photobiol.*, 1992, Vol. 14, pp. 262-266.
2. Simões C., Gomes M.C., Neves M.G.P.M.S., Cynha Å., Tomé J.P.C., Tomé A.C., Cavaleiro J.A.S., Almedia A., Faustino M.A.F. Photodynamic inactivation of *Escherichia coli* with cationic meso-tetraarylporphyrins – The charge number and charge distribution effects, *Catalysis Today*, 2016, Vol. 266, pp. 197-204.
3. Strakhovskaya M.G., Antonenko Yu.N., Pashkovskaya A.A., Kotova E.A., Kireev V., Zhukhovitskii V.G., Kuznetsova N.A., Yuzhakova O.A., Negrimovskii V.M., Rubin A.B. Electrostatic binding of substituted metallophthalocyanines to enterobacteria cells: role in photodynamic inactivation, *Biokhimiya*, 2009, Vol. 74, Is. 12, pp. 1603-1614. (in Russian)
4. Meerovich G.A., Tiganova I.G., Makarova E.A., Meerovich I.G., Romanova Ju.M., Tolordova E.R., Alekseeva N.V., Stepanova T.V., Koloskova Yu., Luk'anets E.A., Krivospitskaya N.V., Sipailo I.P., Baikova T.V., Lostchenov V.B., Gonchukov S.A. Photodynamic inactivation of bacteria and biofilms using cationic bacteriochlorins, *J. of Physics: Conference Series*, 2016, Vol. 691. doi: 10.1088/1742-6596/691/1/012011
5. Usacheva M.N., Teichert M.C., Biel M.A. Comparison of the methylene blue and toluidine blue photobactericidal efficacy against gram-positive and gram-negative microorganisms, *Lasers Surg. Med.*, 2001, Vol. 29(2), pp. 165-173.
6. Li X., Guo H., Tian Q., Zheng G., Hu Y., Fu Y., Tan H. Effects of 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy on antibiotic-resistant staphylococcal biofilm: an *in vitro* study, *J.Surg.Res.*, 2013, Vol. 184, pp. 1013-1021.
7. Wang Y., Zhou Q., Wang Y., Ren J., Zhao H., Wu S., Yang J., Zhen J., Luo Y., Wang X., Gu Y. In vitro photodynamic inactivation effects of Ru(II) complexes on clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* planktonic and biofilm cultures, *Photochem. Photobiol.*, 2015, Vol. 91, pp. 124-133.
8. Cieplik F., Späth A., Regensburger J., Gollmer A., Tabenski L., Hiller K.A., Bäuml W., Maisch T., Schmalz G. Photodynamic biofilm inactivation by SAPYR – an exclusive singlet oxygen photosensitizer, *Free Radical Biology and Medicine*, 2013, Vol. 65, pp. 477-487.

12. Huang L., Huang Y.Y., Mroz P., et al. Stable synthetic cationic bacteriochlorins as selective antimicrobial photosensitizers // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2010. – Vol. 54. – P. 3834-3841.
13. Schastak S., Gitter B., Handzel R., et al. Improved photoinactivation of gram-negative and gram-positive methicillin-resistant bacterial strains using a new near-infrared absorbing meso-tetrahydroporphyrin: a comparative study with a chlorine e6 photosensitizer Photolon // *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* – 2008. – Vol. 30. – P. 129-133.
14. Schastak S., Ziganshyna S., Gitter B., et al. Efficient photodynamic therapy against Gram-positive and Gram-negative bacteria using THPTS, a cationic photosensitizer excited by infrared wavelength // *PLoS One.* – 2010. – Vol. 5. – e11674.
15. Lee C.F., Lee C.J., Chen C.T., Huang C.T. delta-Aminolaevulinic acid mediated photodynamic antimicrobial chemotherapy on *Pseudomonas aeruginosa* planktonic and biofilm cultures // *J Photochem Photobiol B.* – 2004. – Vol. 75. – P. 21-25.
16. Street C.N., Gibbs A., Pedigo L., et al. In vitro photodynamic eradication of *Pseudomonas aeruginosa* in planktonic and biofilm culture // *Photochemistry and Photobiology.* – 2009. – Vol. 85. – P. 137-143.
17. Плотникова Е.А., Лукьянец Е.А., Якубовская Р.И. Сравнительная оценка глубины проникновения светового луча в опухолевую ткань при использовании фотосенсибилизаторов хлороинового и бактериохлороинового рядов // *Biomedical Photonics.* - Спец. Выпуск «Материалы V Всероссийской конференции «Фотодинамическая терапия и Фотодиагностика». – 2016. – С. 12.
18. *Biofilm infections* / by ed. Bjarnsholt T. – Heidelberg: Springer, 2011. – 314 p.
19. Макарова Е.А., Якубовская Р.И., Ворожцов Г.Н. и др. Фотосенсибилизатор для фотодинамической терапии // Патент России № 254995. – 2013.
20. Dudkin S.V., Makarova E.A., Slivka L.K., Lukyanets E.A. Synthesis and properties of tetra- and octacationic meso-tetrakis(3-pyridyl)bacteriochlorin derivatives // *J. Porphyrins Phthalocyanines.* – 2014. – Vol. 18. – P. 107-114.
9. Kim H.-J., Lindsey J.S. De novo synthesis of stable tetrahydroporphyrinic heterocycles: bacteriochlorins and a tetrahydrocorrin, *J Org. Chem.*, 2005, Vol. 70, pp. 5475-5486.
10. Krayer M., Ptaszek M., Kim H.J., Meneely K.R., Fan D., Secor K., Lindsey J.S. Expanded scope of synthetic bacteriochlorins via improved acid catalysis conditions and diverse dihydrodipyrin-acetals, *J Org. Chem.*, 2010, Vol. 75, pp. 1016-1039.
11. Mass O., Lindsey J.S. A trans-AB-bacteriochlorin building block, *J. Org. Chem.*, 2011, Vol. 76, pp. 9478-9487.
12. Huang L., Huang Y.Y., Mroz P., Tegos G.P., Zhiyentayev T., Sharma S.K., Lu Z., Balasubramanian T., Krayer M., Ruzié C., Yang E., Kee H.L., Kirmaier C., Diers J.R., Bocian D.F., Holten D., Lindsey J.S., Hamblin M.R. Stable synthetic cationic bacteriochlorins as selective antimicrobial photosensitizers, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2010, Vol. 54, pp. 3834-3841.
13. Schastak S., Gitter B., Handzel R., Hermann R., Wiedemann P. Improved photoinactivation of gram-negative and gram-positive methicillin-resistant bacterial strains using a new near-infrared absorbing meso-tetrahydroporphyrin: a comparative study with a chlorine e6 photosensitizer Photolon, *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.*, 2008, Vol. 30, pp. 129-133.
14. Schastak S., Ziganshyna S., Gitter B., Wiedemann P., Claudepierre T. Efficient photodynamic therapy against Gram-positive and Gram-negative bacteria using THPTS, a cationic photosensitizer excited by infrared wavelength, *PLoS One*, 2010, Vol. 5, e11674.
15. Lee C.F., Lee C.J., Chen C.T., Huang C.T. delta-Aminolaevulinic acid mediated photodynamic antimicrobial chemotherapy on *Pseudomonas aeruginosa* planktonic and biofilm cultures, *J Photochem Photobiol B*, 2004, Vol. 75, pp. 21-25.
16. Street C.N., Gibbs A., Pedigo L., Andersen D., Loebel N.G. In vitro photodynamic eradication of *Pseudomonas aeruginosa* in planktonic and biofilm culture, *Photochemistry and Photobiology*, 2009, Vol. 85, pp. 137-143.
17. Plotnikova E.A., Lukyanets E.A., Yakubovskaya R.I. Comparative evaluation of the light beam penetration depth into tumor tissue using chlorin and bacteriochlorin series photosensitizers, *Biomedical Photonics, Sp. Is. Materialy V Vserossiiskoi konferentsii Fotodinamicheskaya terapiya i Fotodiagnostika*, 2016, p. 12. (in Russian)
18. *Biofilm infections*, by ed. Bjarnsholt T. Heidelberg, Springer, 2011. 314 p.
19. Makarova E.A., Yakubovskaya R.I., Vorozhtsov G.N., Morozova N.B., Lukyanets E.A., Lastovoi A.P., Plotnikova E.A. *Fotosensibilizator dlya fotodinamicheskoi terapii* [Photosensitizer for photodynamic therapy]. Patent RF, no 254995, 2013.
20. Dudkin S.V., Makarova E.A., Slivka L.K., Lukyanets E.A. Synthesis and properties of tetra- and octacationic meso-tetrakis(3-pyridyl)bacteriochlorin derivatives, *J. Porphyrins Phthalocyanines*, 2014, Vol. 18, pp. 107-114.