

<https://doi.org/10.31631/2073-3046-2024-23-3-19-26>

Фотодинамическая инактивация как перспективный метод борьбы с резистентными штаммами стафилококков

Д. В. Квашнина^{*1}, И. Ю. Широкова¹, Н. А. Белянина¹, О. В. Иванова¹,
Н. В. Стифеева¹, О. В. Ковалишена¹, С. А. Сырбу², Н. Ш. Лебедева²

¹ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет»
Минздрава России, г. Нижний Новгород

²Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химии
растворов им. Г. А. Крестова Российской академии наук, г. Иваново

Резюме

Актуальность. Разработка противомикробных препаратов и альтернативных методов, технологий и средств профилактики, диагностики и лечения инфекционных заболеваний человека, вызванных антибиотикорезистентными микроорганизмами, является одной из приоритетных задач обеспечения биологической безопасности страны. **Цель.** Оценить бактерицидную активность тетрапиррольных макрогетероциклов (порфиринов) при разной длительности облучения светом по отношению к стафилококкам, *in vitro*. **Материалы и методы.** Исследуемые штаммы микроорганизмов: музейные штаммы микроорганизмов *S. aureus* ATCC 29213, *S. epidermidis* ATCC 14990 и антибиотикорезистентные штаммы бактерий рода *Staphylococcus* ($n = 18$), выделенные из клинического биоматериала и с объектов окружающей среды в медицинской организации. Исследуемые фотосенсибилизаторы: соединения водорастворимых несимметрично замещенных порфиринов, содержащих на периферии порфиринового цикла гетероциклические фрагменты (остатки бензоксазола, *N*-метилбензимидазола и бензотиазола). **Результаты и обсуждение.** Активность всех трех соединений порфиринов по отношению к музейным штаммам стафилококков и 77,8% клинических антибиотикорезистентных штаммов ($n=14$, 95% ДИ [20,1–97,5] оказалась максимальной (полный лизис) уже после 10 минут облучения. **Выводы.** Протестированные тетрапиррольные макрогетероциклы (порфирины) проявляют бактерицидную активность в отношении музейных и клинических штаммов стафилококков с разным уровнем резистентности к антибиотикам, что определяет их перспективы применения как противомикробных лекарственных препаратов.

Ключевые слова: фотодинамическая инактивация, фотосенсибилизатор, водорастворимый порфирин, стафилококки, антибиотикорезистентность, фотохимия
Конфликт интересов не заявлен.

Для цитирования: Квашнина Д. В., Широкова И. Ю., Белянина Н. А. и др. Фотодинамическая инактивация как перспективный метод борьбы с резистентными штаммами стафилококков. Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. 2024;23(3):19-26. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2024-23-3-19-26>

Photodynamic Inactivation as a Promising Method of Combating Resistant Strains of Staphylococci

DV Kvashnina^{**1}, IYu Shirokova¹, NA Belyanina¹, OV Ivanova¹, NV Stifeeva¹, OV Kovalishena¹, SA Syrbu², NSh Lebedeva²

¹Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Privolzhsky Research Medical University» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Nizhny Novgorod, Russia

²G.A. Krestov Institute of Solution Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Ivanovo, Russia

Abstract

Relevance. The development of antimicrobial drugs and alternative methods, technologies and means of prevention, diagnosis and treatment of human infectious diseases caused by antibiotic-resistant microorganisms is one of the priorities of ensuring the biological safety of the country. **Aims.** To evaluate the bactericidal activity of tetrapyrrole macroheterocycles (porphyrins) at different light irradiation durations in relation to staphylococci, *in vitro*. **Materials and methods.** Studied strains of microorganisms: museum strains of microorganisms – *S. aureus* ATCC 29213, *S. epidermidis* ATCC 14990 and antibiotic-resistant strains of bacteria of the genus *Staphylococcus* ($n=18$) isolated from clinical biomaterial and from environmental objects in a medical organization. The studied chemical compounds are three different compounds of water-soluble asymmetrically substituted porphyrins containing

* Для переписки: Квашнина Дарья Валерьевна, к. м. н., доцент кафедры эпидемиологии, микробиологии и доказательной медицины ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России, 603950, БОКС-470, г. Нижний Новгород, пл. Минина и Пожарского, д. 10/1. +7 (831) 422-12-50, факс: +7 (831) 439-01-84, [HYPERLINK "mailto:kanc@pimunn.net" kanc@pimunn.net](mailto:kanc@pimunn.net). ©Квашнина Д. В. и др.

** For correspondence: Kvashnina Darya V., Cand. Sci. (Med.), associate professor of the Department of Epidemiology, Microbiology and Evidence-Based, Medicine Privolzhsky Research Medical University, 10/1, Minin and Pozharsky square, BOX-470, Nizhny Novgorod, 603950, Russia. ©Kvashnina DV, et al.

heterocyclic fragments on the periphery of the porphyrin cycle (residues of benzoxazole, N-methylbenzimidazole and benzothiazole).

Results. The activity of all three porphyrin compounds in relation to museum strains of staphylococcus and 77.8% of clinical antibiotic-resistant strains (n=14; 95% CI 20.1-97.5) turned out to be maximal (complete lysis) after 10 minutes of irradiation. **Conclusions.** The tested tetrapyrrole macroheterocycles (porphyrins) exhibit bactericidal activity against museum and clinical strains of staphylococcus, with different levels of antibiotic resistance, which determines

Keywords: antibiotic resistance, water-soluble porphyrin, photodynamic inactivation, photosensitizer, photochemistry, staphylococci
No conflict of interest to declare.

For citation: Kvashnina DV, Shirokova IYu, Belyanina NA, et al. Photodynamic inactivation as a promising method of combating resistant strains of staphylococci. *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2024;23(3):19-26 (In Russ.). <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2024-23-3-19-26>

Введение

Одной из остро стоящих на глобальном уровне проблем здравоохранения в настоящее время является формирование и распространение резистентности к антимикробным препаратам, биологическим, химическим и физическим противомикробным средствам [1–3]. Для решения этой проблемы Правительством РФ в 2017 г. принята «Стратегия предупреждения распространения антимикробной резистентности в РФ на период до 2030 г.» [4]. В целях предупреждения и ограничения распространения резистентности к антимикробным препаратам и средствам в стране поставлен ряд задач, требующих решения, в том числе разработка противомикробных препаратов и альтернативных методов, технологий и средств профилактики, диагностики и лечения инфекционных заболеваний человека, животных и растений [4].

Большой научный интерес вызывает разработка альтернативных методов и биоцидов, способных преодолевать полирезистентность ведущих возбудителей инфекций. Одним из перспективных направлений является антимикробная фотодинамическая инактивация (ФДИ), впервые описанная более века назад, интерес к которой в настоящее время снова возрос в связи с дефицитом возможностей борьбы против полирезистентных к антимикробным препаратам микроорганизмов [5–7].

В основе фотодинамической инактивации микробных клеток находится фотохимическая реакция с выделением активных форм кислорода, вырабатываемых молекулами нетоксичного красителя или фотосенсибилизатора в присутствии низкоинтенсивного видимого света [8]. При добавлении фотосенсибилизатора к суспензии микроорганизмов или при введении его в очаг раневой инфекции химическое вещество поглощается клеткой-мишенью и в неактивном состоянии является инертным [8,9].

Поглощение и накопление фотосенсибилизатора, как и любых других веществ, происходит преимущественно в энергодефицитных клетках [9–11], к которым относятся микробные, опухолевые и стареющие клетки.

Фотохимический процесс включает возбуждение молекулы фотосенсибилизатора светом с

определенной длиной волны, соответствующей полосе поглощения. Молекула вещества переходит в первое возбужденное синглетное состояние, которое затем может подвергаться межсистемному переходу в несколько более низкое энергетически, но более долговечное триплетное состояние [8,12]. В таком состоянии молекула проходит фотохимические пути типа I или/и типа II с образованием супероксида, гидроксильных радикалов и синглетного кислорода, что приводит к окислению биомолекул микроорганизмов-мишеней и цитотоксичности [8,9,12].

ФДИ лежит в основе метода антимикробной фотодинамической терапии (ФДТ), нашедшего свое место в различных направлениях клинической медицины: хирургии, гинекологии, отоларингологии, стоматологии, дерматовенерологии и др. [5,8,11]. Активное клиническое применение данного метода в лечебной практике было ограничено отсутствием нетоксичных препаратов с высокой эффективностью.

Изучение антимикробной активности экспериментальных фотосенсибилизаторов в поиске новых эффективных и нетоксичных соединений является актуальной задачей [13].

Перспективными фотосенсибилизаторами являются порфирины, так как они генерируют синглетный кислород и имеют практически неограниченные возможности химической модификации периферийных заместителей для селективного связывания с биомишенями [14–16].

Ранее авторскими коллективами Института химии растворов имени Г. А. Крестова Российской академии наук, Ивановского государственного химико-технологического университета, НИИ профилактической медицины Университетской клиники Приволжского исследовательского медицинского университета (ФГБОУ ВО ПИМУ Минздрава России) [17] было проведено прямое и обратное спектрофотометрическое титрование взаимодействия (связывания) альбумина с моногетерилзамещенными порфиринами. Альбумин был выбран в качестве мишени главным образом по причине того, что имеет молекулярную массу (65 кДа), близкую к массе поверхностного белка А (40–60 кДа) *S. aureus* и к массе белка G (58–65 кДа) стафило-

кокков. Результаты исследования свидетельствовали об образовании полуинтеркаляционных комплексов порфиринов с двухцепочечной ДНК. Эти данные позволили предположить, что порфирины при взаимодействии нацелены на поверхностные белки и генетический материал микроорганизмов рода *Staphylococcus*. Результаты исследования стали базой для проведения дальнейших исследований особенностей антимикробного эффекта моногетерилзамещенных порфиринов.

Цель исследования – оценить бактерицидную активность тетрапиррольных макрогетероциклов (порфиринов) при разной длительности облучения светом по отношению к стафилококкам, *in vitro*.

Материалы и методы

На базе бактериологической лаборатории Университетской клиники ФГБОУ ВО ПИМУ Минздрава России были проведены экспериментальные исследования *in vitro* по изучению бактерицидной активности тетрапиррольных макрогетероциклов (порфиринов) для определения перспектив их применения как противомикробных лекарственных препаратов, антисептических и дезинфицирующих средств. Исследование запланировано как поисковое, комплексное. Этапы:

- 1) Выбор нескольких типов химического соединений тетрапиррольных макрогетероциклов (порфиринов) в качестве фотосенсибилизаторов.
- 2) Выбор культур микроорганизмов для эксперимента, характеристика их свойств (антибиотикорезистентность).
- 3) Оценка бактерицидного эффекта порфиринов в отношении музейных штаммов и клинических штаммов при определенных параметрах фотооблучения.

Изучаемые несимметричные водорастворимые порфирины, содержащие на периферии порфиринового цикла гетероциклические фрагменты (остатки бензоксазола, N-метил бензимидазола и бензотиазола), были синтезированы группой исследователей Института химии растворов имени Г. А. Крестова Российской академии наук (г. Иваново) с использованием метода C–N-активации [17].

Исследовались три разных соединения моногетерилзамещенных порфиринов:

- 1) триодид 5-[4'-(1'',3''-бензотиазол-2''-ил) фенил]-10,15,20-трис(N-метилпирдин-3'-ил) порфирина (S-por);
- 2) триодид 5-[4'-(1'',3''-бензоксазол-2''-ил) фенил]-10,15,20-трис(N-метилпирдин-3'-ил) порфирина (O-por);
- 3) триодид 5-[4-(N-метил-1'',3''-бензимидазол-2''-ил)фенил]-10,15,20-трис(N-метил-пирдин-3'-ил)-порфирина (N-por).

Источник света: светодиодная лампа мощностью 20 Вт.

Исследуемые штаммы микроорганизмов:

- 1) музейные штаммы микроорганизмов – *S. aureus* ATCC 29213 и *S. epidermidis* ATCC 14990;

- 2) антибиотикорезистентные штаммы бактерий рода *Staphylococcus* (n = 18), выделенные из клинического биоматериала (раневое отделяемое) от пациентов с гнойно-септическими инфекциями кожи и мягких тканей (n = 10) и с объектов окружающей среды в медицинской организации (n = 8).

В лабораторных условиях было выполнено 650 исследований, включающих в себя выделение и идентификацию микроорганизмов из биоматериала от пациентов, в смывах с объектов внешней среды, определение антибиотикорезистентности, установление и оценку бактерицидной активности тетрапиррольных макрогетероциклов (порфирины) в условиях фотооблучения.

Видовая идентификация микроорганизмов выполнялась на масс-спектрометре MALDI-TOF MS (Германия). Изучение чувствительности к антибактериальным препаратам проводилось на бактериологическом анализаторе Vitek 2 (Франция). Распространенность генов резистентности определяли с применением наборов реагентов «АмплиСенс MDR MBL-FL; MDR Acinetobacter OXAFL» и «Литех» (Россия) для выделения генов резистентности методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме реального времени. У стафилококков детектировали ген *mecA*.

Чувствительность бактерий к антибиотикам определяли согласно клиническим рекомендациям «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам, версия-2021-01» [18]. Сводку и группировку данных по видовому составу выделенной микрофлоры и ее свойствам проводили с помощью компьютерной программы «WHONET» версия 2023.

Ход эксперимента *in vitro*. Из суточной культуры микроорганизмов готовили суспензию 0,5 мутности по стандарту МакФарланда, стерильным тампоном наносили суспензию микроорганизмов в трех направлениях на подсушенную чашку Петри с плотной питательной средой (Агар Колумбийский с бараньей кровью), далее 0,1 мл раствора изучаемого химического вещества ($1 \cdot 10^{-5}$ моль $\cdot$ л $^{-1}$) в буфере PBS (pH 7.4) капаля на поверхность питательной среды, не растирая, давали высохнуть. Полученные образцы подвергали облучению светом на расстоянии 22 см от чашки Петри в течение 10 и 15 минут. После времени экспозиции светом чашки Петри помещали в термостат при температуре 37 °C на 24 часа.

Для определения наличия и оценки бактерицидной активности тетрапиррольных макрогетероциклов (порфиринов), которые в перспективе могут применяться как противомикробные лекарственные препараты, антисептические и дезинфицирующие средства, была выбрана методика исследования чувствительности к бактериофагам – оценка литической активности бактериофага методом «стерильного пятна» ([19].

Таблица 1. Профили резистентности протестированных микроорганизмов рода *Staphylococcus*
Table 1. Resistance profiles of the tested microorganisms of the genus *Staphylococcus*

Микроорганизм и идентификационный номер по лабораторному журналу/особые отметки о резистентности The microorganism and the identification number according to the laboratory journal/special marks on resistance	Профиль резистентности Resistance profile
<i>S. aureus</i> 229 / бета-лактамазы +	B -- PL – H
<i>S. aureus</i> 259	-- PL –
<i>S. aureus</i> 409/ бета-лактамазы +	B -- PL –
<i>S. aureus</i> 491/ бета-лактамазы +, XR / mecA+	B --XGPL – H
<i>S. aureus</i> 134	-- -- -- --
<i>S. aureus</i> 56 / XR / mecA+	--XGPL –
<i>S. aureus</i> 99/ XR / mecA+	---XGPL –
<i>S. epidermidis</i> 459	-- PLN-E
<i>S. epidermidis</i> 2003	--C-- --
<i>S. epidermidis</i> 7 / XR / mecA+	--XGPLN- Z H -
<i>S. haemolyticus</i> 525 / XR / mecA+	---X-----
<i>S. haemolyticus</i> 530 / XR / mecA+	---X-----
<i>S. haemolyticus</i> 143 / XR / mecA+	-CFX – -E- ---
<i>S. haemolyticus</i> 471	---- -L – --
<i>S. haemolyticus</i> 487	-----
<i>S. hominis</i> 524	-----
<i>S. hominis</i> 527	-----
<i>S. warneri</i> 2000	-- – G- NM – ---

Примечание: Использованы экспертные правила интерпретации профиля резистентности: «буква» – резистентность или умеренная чувствительность к определенному антибиотику; «пробел» – чувствительность; «-» – не проверена чувствительность. Расшифровка буквенных кодов в профилях резистентности: B – бензилпенициллин; R – рифампицин; C – цефтриаксон; F – цефотаксим; X – цефокситин; G – гентамицин; P – ципрофлоксацин; L – левофлоксацин; N – клиндамицин; M – линкомицин; E – эритромицин; Z – линезолид; V – ванкомицин; H – хлорамфеникол; T – тетрациклин; Y – тигециклин. XR – резистентность к цефокситину. «mecA+» – у штамма обнаружен соответствующий ген.

Note: Expert rules for interpreting the resistance profile were used: «letter» – resistance or moderate sensitivity to a particular antibiotic; «space» – sensitivity; «-» – sensitivity has not been tested. Decoding of letter codes in resistance profiles: B – benzylpenicillin; R – rifampicin; C – ceftriaxone; F – cefotaxime; X – cefoxitin; G – gentamicin; P – ciprofloxacin; L – levofloxacin; N – clindamycin; M – lincomycin; E – erythromycin; Z – linezolid; V – vancomycin; H – chloramphenicol; T – tetracycline; Y – tigecycline.

XR is resistance to cefoxitin. «mecA+» – the corresponding gene has been detected in the strain.

Критерии оценки: на плотной питательной среде – оценка литической активности по методу «стерильного пятна» по пятибалльной шкале (по количеству «крестов», где «-» – нет литической активности, «+» низкая активность, и т.д. до «++++» прозрачная зона лизиса без колоний вторичного роста).

Оценка бактерицидной активности проводилась с учетом экспозиции (времени фотооблучения) и фотоагента.

Параллельно контролировалась стерильность растворов порфиринов (контроль №1, 2, 3) и отсутствие бактерицидного эффекта порфиринов в условиях отсутствия фотооблучения для каждого тестируемого штамма.

Обработку данных осуществляли в среде R (Rstudio 1.1.463). Принадлежность выборок к нормальному распределению проверяли с помощью критерия Шапиро-Уилка, построения графика квартилей (QQ). При нормальном распределении количественных данных использованы параметри-

ческие критерии анализа, такие как однофакторный дисперсионный анализ с проверкой равенства дисперсий выборок (критерий Левена) и последующим проведением апостериорного теста (поправка Бонферрони), непарный t-критерий Стьюдента. Качественные данные сравнивали с помощью критерия χ^2 . Расчет доверительных интервалов для частот (качественные данные) осуществлялся с помощью критериев Уилсона-Вальда с коррекцией по Агрести-Коулу и углового преобразования Фишера. Уровень статистической значимости различий при проверке гипотез – $p \leq 0,05$.

Результаты

На первом этапе исследования нами были выбраны наиболее перспективные по результатам спектрофотометрического титрования [17] соединения несимметричных водорастворимых порфиринов, содержащих на периферии порфиринового цикла гетероциклические фрагменты (остатки бензоксазола, N-метил бензимидазола и бензотиазола).

На втором этапе был проведен отбор штаммов стафилококков, интересных для изучения: музейные тест-штаммы с известными свойствами (*S. aureus* ATCC 29213, *S. epidermidis* ATCC 14990) и клинические штаммы от человека и из окружающей среды медицинской организации.

Видовая структура тестируемой клинической выборки: *Staphylococcus aureus* (n = 7; 38,9%), *Staphylococcus epidermidis* (n = 3; 16,7%), *Staphylococcus haemolyticus* (n = 5; 27,8%), *Staphylococcus hominis* (n = 2; 11,1%), *Staphylococcus warneri* (n = 1; 5,6%). Большинство идентифицированных клинических штаммов проявляли антибиотикорезистентность (табл. 1). Анализ профилей резистентности клинических штаммов позволяет сказать, что 77,8% штаммов проявляли резистентность к 1–7 антибиотикам (см. табл. 1). Внутри разных групп, сформированных по виду стафилококков, определялись чувствительные и резистентные микроорганизмы. Такой подбор штаммов был связан с необходимостью показать бактерицидную активность порфиринов в отношении культур с разными профилями резистентности.

Наиболее высокий уровень резистентности к протестированным антибиотикам наблюдался к ципрофлоксацину (62,5%, 95% ДИ [25,9–89,8]), бензилпенициллину (60,0%, 95% ДИ [17,0–92,7]), цефтриаксону (50,0%, 95% ДИ [9,2–90,8]) (рис. 1).

Обращает на себя внимание факт, что уровень резистентности к цефокситину составляет 41,2% (95% ДИ [20,4–73,9]) (рис. 1). Изоляты, резистентные к цефокситину, являются резистентными

ко всем пенициллинам [18]. Распространенность носительства гена *mecA* составила 38,9% (95% ДИ [12,3–94,5]) (см. табл. 1), что является тревожным клиническим и эпидемиологическим признаком. Доля золотистого стафилококка с геном *mecA* составила 42,9% (3/7), среди коагулазонегативных стафилококках – 36,4% (4/11).

Таким образом, нами была сделана выборка стафилококков, состоящая из штаммов с разным уровнем антибиотикочувствительности даже внутри одного вида, выделенных из клинического материала (для определения возможных перспектив применения порфиринов как антимикробных и антисептических средств) и из окружающей среды (для применения в качестве дезинфектантов).

На третьем этапе исследования проведена непосредственная оценки бактерицидной активности тетрапиррольных макрогетероциклов (порфиринов) в отношении стафилококков при разной длительности облучения.

Без фотовоздействия (табл. 2) наблюдался активный рост всех исследуемых видов микроорганизмов вне зависимости от вида тетрапиррольного макрогетероцикла (порфирина), что подтверждает отсутствие бактерицидного эффекта без источника света.

Тестируемые соединения порфиринов проявили антимикробную активность в отношении и музейных культур, и клинических штаммов стафилококка, выделенных от пациентов с раневыми инфекциями и из внешней среды медицинской организации (см. табл. 2) при 10 и 15 минутах облучения.

Рисунок 1. Антибиотикорезистентность выделенных стафилококков
Figure 1. Antibiotic resistance of isolated microorganisms of the genus *Staphylococcus*

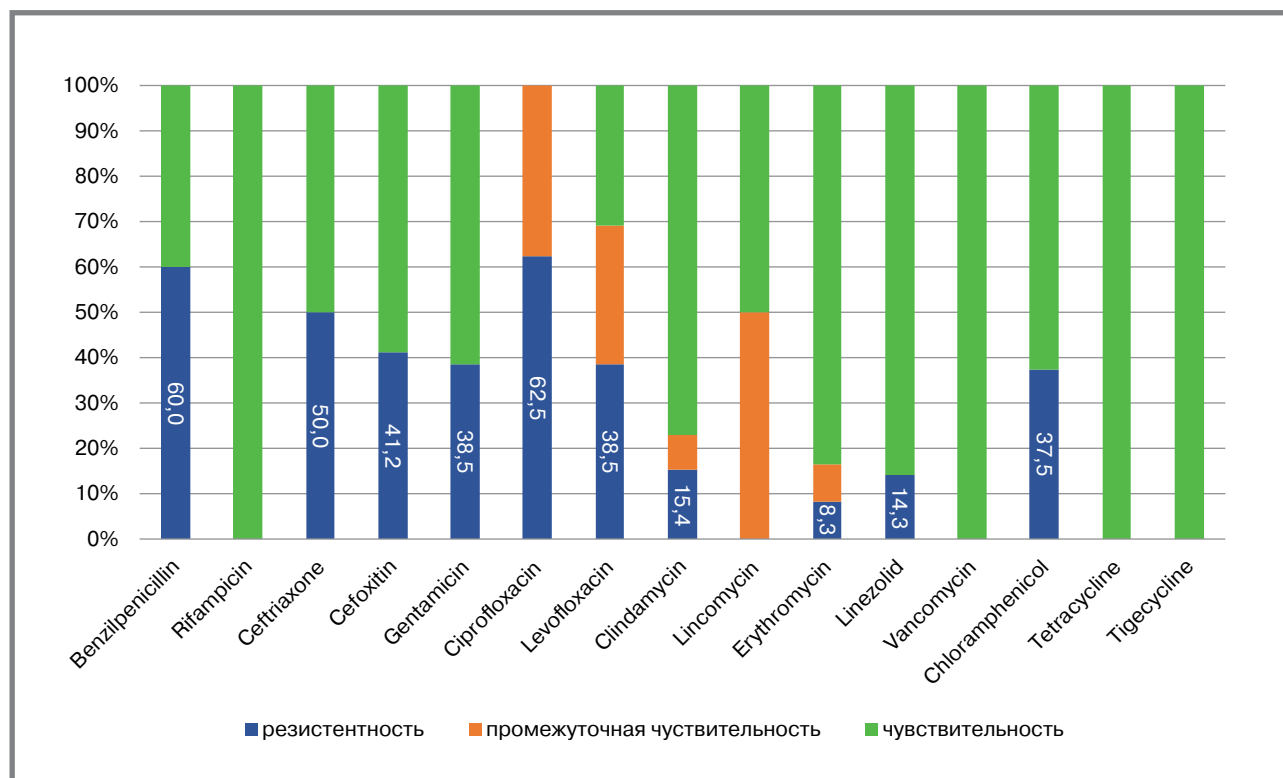


Таблица 2. Оценка бактерицидной активности 3 типов порфиринов по пятибалльной шкале при экспозиции 10 и 15 минут.
Table 2. Evaluation of the bactericidal activity of 3 types of porphyrins on a five-point scale at exposure of 10 and 15 minutes.

Тип порфирина Type of porphyrin	Происхождение штамма the origin of the strain	S-por			O-por			N-por		
		свет 10, light 10,	свет 15, light 15,	без света no light	свет 10, light 10,	свет 15, light 15,	без света no light	свет 10, light 10,	свет 15, light 15,	без света no light
1. <i>S. aureus</i> ATCC 29213	M ¹	++++	++++	CP ³	++++	++++	CP	++++	++++	CP
2. <i>S. epidermidis</i> ATCC 14990	M	++++	++++	CP	++++	++++	CP	++++	++++	CP
3. 7 <i>S. epidermidis</i>	K ²	++++	++++	CP	++++	++++	CP	++++	++++	CP
4. <i>S. epidermidis</i> 459	K	++++	++++	CP	++++	++++	CP	++++	++++	CP
5. <i>S. aureus</i> 259	K	++++	++++	CP	++++	++++	CP	++++	++++	CP
6. <i>S. aureus</i> 229	K	++++	++++	CP	++++	++++	CP	++++	++++	CP
7. <i>S. aureus</i> 409	K	++++	++++	CP	++++	++++	CP	++++	++++	CP
8. <i>S. aureus</i> 491	K	++++	++++	CP	++++	++++	CP	++++	++++	CP
9. <i>S. aureus</i> 56	K	++++	++++	CP	++++	++++	CP	++++	++++	CP
10. <i>S. aureus</i> 99	K	++++	++++	CP	++++	++++	CP	++++	++++	CP
11. <i>S. hominis</i> 524	C ⁴	++++	++++	CP	++++	++++	CP	++++	++++	CP
12. <i>S. hominis</i> 527	C	++++	++++	CP	++++	++++	CP	++++	++++	CP
13. <i>S. haemolyticus</i> 471	C	++++	++++	CP	++++	++++	CP	++++	++++	CP
14. <i>S. haemolyticus</i> 487	C	++++	++++	CP	++++	++++	CP	++++	++++	CP
15. <i>S. haemolyticus</i> 525	C	++++	++++	CP	++++	++++	CP	++++	++++	CP
16. <i>S. haemolyticus</i> 530	C	++++	++++	CP	++++	++++	CP	++++	++++	CP
17. <i>S. haemolyticus</i> 143	K	++++	++++	CP	++++	++++	CP	++++	++++	CP
18. <i>S. aureus</i> 134	K	+	++	CP	+	+++	CP	-	-	CP
19. <i>S. epidermidis</i> 2003	C	++++	++++	CP	++++	++++	CP	++	++	CP
20. <i>S. warneri</i> 2000	C	++++	++++	CP	++++	++++	CP	-	-	CP

Примечание: 1. Музейный штамм; 2. К – клинический штамм, выделенные из биоматериала пациента; 3. CP – сплошной рост; 4. C – штамм, выделенный из смыва с объекта внешней среды. Оценка бактерицидной активности по пятибалльной шкале (по количеству «крестов»): «-» отсутствие литической активности; «++» низкая активность; «+++» образование зоны лизиса с большим количеством колоний вторичного роста бактерии; «++++» зона лизиса с единичными колониями вторичного роста; «+++++» прозрачная зона лизиса без колоний вторичного роста.
 Note: 1. Museum strain; 2. K – clinical strain isolated from the patient's biomaterial; 3. CP – continuous growth; 4. C – strain isolated from flushing from an environmental object. Evaluation of bactericidal activity on a five-point scale (according to the number of «crosses»): «-» lack of lytic activity; «++» low activity; «+++» formation of a lysis zone with a large number of colonies of secondary bacterial growth; «++++» lysis zone with single colonies of secondary growth; «+++++» a transparent lysis zone without secondary growth colonies.

Степень литической активности варьировалась от «+» (низкая активность) до «++++» (прозрачная зона лизиса без колоний вторичного роста) (см. табл. 2).

Активность порфиринов по отношению к музейным штаммам стафилококков оказалась максимальной (на «++++») уже после 10 минут облучения. Первоначально положительный результат был закреплён при экспозиции светом 15 минут, что послужило толчком для дальнейшего эксперимента с клиническими штаммами и выбором времени воздействия светом.

Для 77,8% немусейных штаммов ($n = 14$; 95% ДИ [20,1–97,5]) все три тестируемых фотосенсибилизатора обеспечили полный лизис культур после 10 минут облучения и далее (см. табл. 2). Отмечено, что 90,0% клинических штаммов от пациентов (9/10) и 75,0% (6/8) штаммов из внешней среды были эффективно лизированы тестируемыми порфиринами. Среди полностью антибиотикочувствительных штаммов ($n = 4$) только один (*S. aureus* 134) не был лизирован всеми тремя соединениями на «++++». Среди штаммов, проявляющих антибиотикорезистентность ($n = 14$), только 2 штамма не были лизированы полностью N-por порфирином (см. табл. 2).

Низкая бактерицидная активность («+») была отмечена для клинического штамма *S. aureus* 134, выделенного от пациента со свищевым ходом в области послеоперационного шва, при экспозиции светом 10 минут при двух соединений порфиринов. Надо отметить, что увеличение времени экспозиции до 15 минут ведет к нарастанию литического эффекта в отношении *S. aureus* 134 до «++» при порфирине S-por и до «+++» – O-por.

Неоптимистичный результат был определен для порфирина, содержащего остатки N-метилбензимидазола (N-por), в отношении *S. epidermidis* 2003, *S. warneri* 2000, *S. aureus* 134. Активность к штамму из внешней среды (*S. epidermidis* 2003) была определена на «++» (образование зоны лизиса с большим количеством колоний вторичного роста бактерий) в экспозиции 10 и 15 минут, а в отно-

шении двух других штаммов обнаружено отсутствие литической активности.

Таким образом, чаще отсутствие литического эффекта регистрировалось при воздействии моногетерилзамещенного порфирина, содержащего остатки N-метил-бензимидазола (N-por).

Ни в одном эксперименте не было отмечено полного отсутствия лизиса ни у одного штамма при использовании всех трех соединений порфиринов одновременно.

Растворы химических соединений были стерильны (контроль № 1, 2, 3). В исследовании по контролю стерильности был получен результат «роста нет».

Заключение

Обобщая результат исследования, необходимо отметить, что протестированные тетрапиррольные макрогетероциклы (порфирины) проявили высокую бактерицидную активность в отношении стафилококков. К музейным штаммам она была 100% при использовании всех трех соединений. Для 77,8% клинических штаммов ($n = 14$; 95% ДИ [20,1–97,5]) с разным профилем резистентности все три тестируемых фотосенсибилизатора обеспечили полный лизис культур после 10 минут облучения и длительнее. Среди изучаемых соединений меньшую литическую активность проявил моногетерилзамещенный порфирин, содержащий остатки N-метил-бензимидазола (N-por).

В эксперименте не зафиксировано факта полной нечувствительности какого-либо стафилококка одновременно ко всем трем соединениям порфиринов.

Таким образом, в эксперименте *in vitro* была изучена и оценена бактерицидная активность тетрапиррольных макрогетероциклов (порфиринов) в отношении музейных и клинических штаммов стафилококков, с разным уровнем резистентности к антибиотикам, и определены их перспективы применения как антимикробных препаратов.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-75-01087, <https://rscf.ru/project/23-75-01087/>.

Литература

1. European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial consumption in the EU/EEA (ESAC-Net) -Annual Epidemiological Report 2022. Stockholm: ECDC; 2023. <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/AER-antimicrobial-consumption.pdf>.
2. Global antimicrobial resistance surveillance system (GLASS) report: early implementation 2016-2017. Geneva: World Health Organization; 2017. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
3. Карпов О. Э., Гусаров В. Г., Камышова Д. А. и др. Оценка эффективности применения стратегии сдерживания антибиотикорезистентности: результаты десятилетнего исследования в многопрофильном стационаре. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2023 Т. 25, №3. С. 283–295.
4. Распоряжение Правительства Российской Федерации от 25 сентября 2017 года N 2045-р «Об утверждении «Стратегии предупреждения распространения антимикробной резистентности в Российской Федерации на период до 2030 года».
5. Meerovich G., Akhlyustina E., Romanishkin I., et al. Photodynamic inactivation of bacteria: Why it is not enough to excite a photosensitizer. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2023 Vol. 44. 103853.
6. Rapacka-Zdończyk A., Woźniak A., Michalska K., et al. Factors Determining the Susceptibility of Bacteria to Antibacterial Photodynamic Inactivation. Front Med (Lausanne). 2021 Vol. 12, N8. 642609.
7. Wozniak A., Grinholc M. Combined Antimicrobial Activity of Photodynamic Inactivation and Antimicrobials-State of the Art. Front Microbiol. 2018 Vol.8. N9. P. 930.
8. Kharkwal G., Sharma S., Huang Y., et al. Photodynamic therapy for infections: clinical applications. Lasers Surg Med. 2011 Vol. 43, N7. P.755–767.
9. Кувшинов А.В., Хаумович С.А. Основные механизмы фотодинамической терапии. Современная стоматология. 2012 Т. 54, №1. С. 18–21.
10. Pérez C, Zúñiga T, Palavecino C. Photodynamic therapy for treatment of Staphylococcus aureus infections. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2021 Vol. 34. P.102285.
11. Rkein A., Ozog D. Photodynamic therapy. Dermatol Clin. 2014 Vol. 32, N3. P. 415–425.
12. Sulek A., Pucelik B., Kobielski M., et al. Photodynamic inactivation of bacteria with porphyrin derivatives: effect of charge, lipophilicity, ROS generation, and cellular uptake on their biological activity in vitro. Int J Mol Sci. 2020 Vol.21. P.8716.

13. Раджабов А.А., Дербенев В.А., Исмаилов Г.И., и др. Антибактериальная фотодинамическая терапия гнойных ран мягких тканей. *Лазерная медицина*. 2017 Т. 21, №2. С. 46–49.
14. Dabrowski J. Reactive oxygen species in photodynamic therapy: mechanisms of their generation and potentiation. *Adv. Inorg. Chem.* 2017 Vol. 70. P. 343–394.
15. Kustov A., Morshnev Ph., Kukushkina N., et al. The effect of molecular structure of chlorin photosensitizers on photo-bleaching of 1,3-diphenylisobenzofuran—the possible evidence of iodine reactive species formation. *Comptes Rendus Chimie*. 2022 Vol.25. P.97.
16. Lebedeva NS, Gubarev YA, Koifman MO, et al. The Application of Porphyrins and Their Analogues for Inactivation of Viruses. *Molecules*. 2020 Vol. 25, N19. P. 4368.
17. Киселев А. Н., Лебедева М. А., Сырбу С. А. и др. Синтез и исследование водорастворимых несимметричных катионных порфиринов как потенциальных фотоинактиваторов патогенов. *Известия Академии наук. Серия химическая*. 2022 Т. 71, № 12. С. 2691–2700.
18. Рекомендации. Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам. Версия 2021–01. Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии. М.: 2021. <https://www.antibiotic.ru/files/321/clrec-dsma2021.pdf>. Ссылка активна на 01.04.2024.
19. Асланов Б. И., Зуева Л. П., Пунченко О. Е. и др. Рациональное применение бактериофагов в лечебной и противоэпидемической практике. *Методические рекомендации*. Москва, 2022. 32 с.

References

1. European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial consumption in the EU/EEA (ESAC-Net) -Annual Epidemiological Report 2022. Stockholm: ECDC; 2023.
2. Global antimicrobial resistance surveillance system (GLASS) report: early implementation 2016–2017. Geneva: World Health Organization; 2017. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
3. Karpov OE, Gusarov VG, Kamyshova DA, et al. Evaluation of the effectiveness of antimicrobial stewardship program: results from a ten-year study in a multidisciplinary hospital Clinical microbiology and antimicrobial chemotherapy.2023;25(3):283–295 (In Russ). DOI 10.36488/cmasc.2023.3.283–295.
4. Rasporazheniye Pravitel'stva Rossiyskoy Federatsii ot 25 sentyabrya 2017 goda N 2045-r «Ob utverzhdenii «Strategii preduprezhdeniya rasprostraneniya antimirnoy rezistentnosti v Rossiyskoy Federatsii na period do 2030 goda» (In Russ).
5. Meerovich G, Akhlyustina E, Romanishkin I, et al. Photodynamic inactivation of bacteria: Why it is not enough to excite a photosensitizer. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2023;44:103853. doi: 10.1016/j.pdpdt.2023.103853.
6. Rapacka-Zdończyk A, Woźniak A, Michalska K, et al. Factors Determining the Susceptibility of Bacteria to Antibacterial Photodynamic Inactivation. *Front Med (Lausanne)*. 2021;12(8):642609. doi: 10.3389/fmed.2021.642609.
7. Woźniak A, Grinholc M. Combined Antimicrobial Activity of Photodynamic Inactivation and Antimicrobials-State of the Art. *Front Microbiol.* 2018; 9(8):930. doi: 10.3389/fmicb.2018.00930.
8. Kharkwal G, Sharma S, Huang Y, et al. Photodynamic therapy for infections: clinical applications. *Lasers Surg Med.* 2011;43(7):755–67. doi: 10.1002/lsm.21080.
9. Kuvshinov AV, Naumovich SA. Osnovnyye mekhanizmy fotodinamicheskoy terapii. *Sovremennaya stomatologiya*. 2012;54(1):18–21. (In Russ).
10. Pérez C, Zúñiga T, Palavecino C. Photodynamic therapy for treatment of *Staphylococcus aureus* infections. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2021;34:102285. doi: 10.1016/j.pdpdt.2021.102285.
11. Rkein AM, Ozog DM. Photodynamic therapy. *Dermatol Clin.* 2014 Jul;32(3):415–25, x. doi: 10.1016/j.det.2014.03.009. PMID: 24891062.
12. Sulek A, Pucelik B, Kobielusz M, et al. Photodynamic inactivation of bacteria with porphyrin derivatives: effect of charge, lipophilicity, ROS generation, and cellular uptake on their biological activity in vitro. *Int J Mol Sci.* 2020;21:8716. DOI: 10.3390/ijms21228716.
13. Radjabov AA, Derbenev VA, Ismailov GI, et al. Antibacterial photodynamic therapy of purulent wounds in soft tissues. *Laser Medicine*. 2017;21(2):46–49. (In Russ.) <https://doi.org/10.37895/2071-8004-2017-21-2-46-49>.
14. Dabrowski J. Reactive oxygen species in photodynamic therapy: mechanisms of their generation and potentiation. *Adv. Inorg. Chem.* 2017; 70:343–394. doi: 10.1016/b.s.adioch.2017.03.002
15. Kustov A., Morshnev Ph., Kukushkina N., et al. The effect of molecular structure of chlorin photosensitizers on photo-bleaching of 1,3-diphenylisobenzofuran—the possible evidence of iodine reactive species formation. *Comptes Rendus Chimie*. 2022;25:97–102; DOI: 10.5802/crchim.158.
16. Lebedeva NS, Gubarev YA, Koifman MO, et al. The Application of Porphyrins and Their Analogues for Inactivation of Viruses. *Molecules*.2020;25(19):4368. DOI: 10.3390/molecules25194368.
17. Kiselev AN, Lebedev MA, Syrbu SA, et al. Sintez i issledovaniye vodorastvorimykh nesimmetrichnykh kationnykh porfirinov kak potentsial'nykh fotoinaktivatorov patogenov. *Izvestiya Akademii nauk. Seriya khimicheskaya*.2022;71(12):2691–2700. (In Russ).
18. Rekomendatsii. Opredelenie chuvstvitel'nosti mikroorganizmov k antimirnoy preparatam. Versiya 2021-01. Mezhregional'naya assotsiatsiya po klinicheskoy mikrobiologii i antimirnoy himioterapii. M.: 2021. Accessed April 1, 2024. (In Russ.). <https://www.antibiotic.ru/files/321/clrec-dsma2021.pdf>
19. Aslanov BI, Zuyeva LP, Punchenko OYe, et al. Ratsional'noye primeneniye bakteriofagov v lechebnoy i protivoepidemicheskoy praktike. *Metodicheskiye rekomendatsii*. Moskva, 2022.32 p. (In Russ).

Об авторах

- **Дарья Валерьевна Квашнина** – к. м. н., доцент кафедры эпидемиологии, микробиологии и доказательной медицины ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России, г. Нижний Новгород. +7 (906) 366-81-49, daria_tsarova@mail.ru. <https://orcid.org/0000-0001-9317-4816>.
- **Ирина Юрьевна Широкова** – к. м. н., врач-бактериолог, заведующая бактериологической лабораторией Университетской клиники ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России, г. Нижний Новгород. +7 (929) 042-65-15, shirokova_i@pimunn.net.
- **Наталья Александровна Белянина** – биолог бактериологической лаборатории Университетской клиники ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России, г. Нижний Новгород. +7 (920) 024-31-71, belyanina_n@pimunn.net.
- **Ольга Владимировна Иванова** – лаборант научно-исследовательского отдела ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России, г. Нижний Новгород. +7 (953) 550-05-29, xelga.vladimirovna@mail.ru.
- **Наталья Васильевна Стифеева** – лаборант научно-исследовательского отдела ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России, г. Нижний Новгород. +7 (960) 194-28-20, stifeeva.n@yandex.ru.
- **Ольга Васильевна Ковалишена** – д. м. н., заведующий кафедрой эпидемиологии, микробиологии и доказательной медицины ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России, г. Нижний Новгород. +7 (903) 608-39-08, kovalishena_o@pimunn.net. <https://orcid.org/0000-0002-9595-547X>.
- **Сырбу Сергей Александрович** – д. х. н., заведующий лабораторией «Новые материалы на основе макроциклических соединений» ИХР РАН, г. Иваново. ssa@isc-ras.ru, <https://orcid.org/0000-0003-1482-2809>.
- **Лебедева Наталья Шамильевна** – д. х. н., заведующая лабораторией «Физическая химия супрамолекулярных систем на основе макроциклических соединений и полимеров» ИХР РАН, г. Иваново. <https://orcid.org/0000-0001-7260-3239>.

Поступила: 22.01.2024. Принята к печати: 11.03.2024.

Контент доступен под лицензией CC BY 4.0.

About the Authors

- **Darya V. Kvashnina** – Cand. Sci. (Med.), associate professor of the Department of Epidemiology, Microbiology and Evidence-Based, Medicine Privolzhsky Research Medical University, Nizhny Novgorod, Russia. +7 (906) 366-81-49, daria_tsarova@mail.ru. <https://orcid.org/0000-0001-9317-4816>.
- **Irina Yu. Shirokova** – Cand. Sci. (Med.), Head of the Bacteriological laboratory, bacteriologist, Privolzhsky Research Medical University, Nizhny Novgorod, Russia. +7 (929) 042-65-15, shirokova_i@pimunn.net.
- **Natalya A. Belyanina** – biologist of the bacteriological laboratory of the University Clinic, Privolzhsky Research Medical University, Nizhny Novgorod, Russia. +7 (920) 024-31-71, belyanina_n@pimunn.net.
- **Olga V. Ivanova** – laboratory assistant of the research department Privolzhsky Research Medical University, Nizhny Novgorod, Russia. +7 (953) 550-05-29, xelga.vladimirovna@mail.ru.
- **Natalia V. Stifeeva** – laboratory assistant of the research department Privolzhsky Research Medical University, Nizhny Novgorod, Russia. +7 (960) 194-28-20, stifeeva.n@yandex.ru.
- **Olga V. Kovalishena** – Dr. Sci. (Med.), Head of the Department of Epidemiology, Microbiology and Evidence-Based Medicine, Privolzhsky Research Medical University, Nizhny Novgorod, Russia. +7 (903) 608-39-08, kovalishena_o@pimunn.net. ORCID 0000-0002-9595-547X.
- **Sergey A. Syrbu** – Dr. Sci. (Chemical), Head of the laboratory «New Materials based on macrocyclic compounds» of the ISC RAS, Ivanovo, Russia. ssa@isc-ras.ru. <https://orcid.org/0000-0003-1482-2809>.
- **Natalia Sh. Lebedeva** – Dr. Sci. (Chemical), Head of the Laboratory «Physical Chemistry of supramolecular systems based on macrocyclic compounds and polymers» ISC RAS, Ivanovo, Russia. +7 (4932) 33-62-72, ns@isc-ras.ru. <https://orcid.org/0000-0001-7260-3239>.

Received: 22.01.2024. Accepted: 11.03.2024.

Creative Commons Attribution CC BY 4.0.