

МИНОБРНАУКИ РОССИИ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра биохимии и биофизики

РОЛЬ ЭНДОГЕННЫХ И ЭКЗОГЕННЫХ ПОРФИРИНОВ ПРИ
АНТИМИКРОБНОМ ФОТОДИНАМИЧЕСКОМ ВОЗДЕЙСТВИИ

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

студентки 4 курса 421 группы
направления 06.03.01 Биология
Биологического факультета
Шарабариной Татьяны Валерьевны

Научный руководитель:

канд. биол. наук, доцент:


30.05.2025

Е.С. Тучина

Зав. кафедрой биохимии и биофизики,

док. биол. наук, профессор:


30.05.2025

С.А. Коннова

Саратов 2025

Введение. *Staphylococcus aureus* является типичным представителем нормальной микрофлоры человека, колонизируя кожу и слизистые оболочки [1]. Но, несмотря на это, стафилококк также является широко распространенным патогеном, вызывающий различные инфекции человека и животных: начиная от легких кожных инфекций и заканчивая опасной для жизни септициемией, менингитом и синдромом токсического шока [2]. Масштабное, часто бесконтрольное применение антибиотиков привело к острой проблеме – появлению резистентности у клинически значимых микроорганизмов к антибактериальным препаратам [3]. Именно поэтому сейчас по всемирно разрабатываются подходы по устранению появления полностью устойчивых и неизлечимых антибактериальными препаратами инфекций. Одним из перспективных решений данной проблемы является антимикробная фотодинамическая терапия (АФДТ), которая основывается на избирательной окислительной деструкции структур микроорганизмов при сочетанном воздействии светодиодного синего излучения на эндогенные или экзогенные порфирины. Эффективность фотоповреждения связана непосредственно с внутриклеточной локализацией фотосенсибилизатора [4]. ФДТ включает в себя три компонента: свет, фотосенсибилизатор (ФС) и кислород. ФС при облучении светом определенной длины волны переходит из основного состояния с низкой энергией в возбужденное синглетное состояние. В последствии фотосенсибилизатор может вернуться в основное состояние с испусканием флуоресцентного излучения или перейти в триплетное состояние с более высокой энергией [5]. За последние десятилетия большая часть работ по АФДТ была сосредоточена на свойствах ФС [6]. Порфирины – представляют собой фотосенсибилизаторы эндогенной или экзогенной природы. Наличие эндогенных порфиринов в клетках большинства патогенных микроорганизмов позволяет использовать для их инактивации оптическое излучение с определенной длиной волны. Экзогенные порфирины вводятся извне и способны

усиливать эффект бактерицидного действия благодаря своим специфическим физико-химическим свойствам [7].

Исходя из выше сказанного, целью нашего исследования является изучение влияния эндогенных и экзогенных порфиринов на эффективность антимикробного фотодинамического воздействия светодиодного излучения фиолетового и синего спектра.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

1. Сравнить чувствительность клеток *S. aureus* 209 P к действию фиолетового (405 нм) и синего (428 нм) излучения *in vitro*;
2. Оценить вклад каротиноидных пигментов в торможение фотодинамических процессов в клетках *S. aureus* 209 P *in vitro*;
3. Проанализировать возможность использования экзогенных порфиринов для повышения эффективности фотодинамического воздействия на клетки *S. aureus* 209 P *in vitro*;
4. Изучить *in vivo* фотодинамическое воздействие светодиодного фиолетового и синего излучения и экзогенного пиридилпорфирина на обсемененность области гнойного абсцесса у лабораторных животных.

Объектами исследования служил стандартный штамм *S. aureus* 209 P (ГИСК им. Л. А. Тарасевича, г. Пущино). Микроорганизмы выращивали при температуре 37 °С на универсальных питательных средах. В качестве среды накопления для выделения каротиноидов использовали среду Петровича следующего состава: МПА, 7,5% NaCl, 10% стерильное обезжиренное молоко [8].

Учет изменения численности микроорганизмов в процессе ФДВ осуществляли путем измерения оптической плотности бактериальных суспензий на планшетном фотометре iMark (Bio Rad, США) на длине волны 660 нм через 24 ч после выращивания [9].

В качестве источника света использовали светодиодные источники излучения: 1) с максимумом спектра испускания на длине волны $\lambda=405$ нм и с

шириной полосы на полувысоте - FWHM = 15 нм и интегральной плотностью мощности 70 мВт/см², 2) с максимумом спектра испускания на длине волны $\lambda=428$ нм и с шириной полосы на полувысоте - FWHM = 30 нм и интегральной плотностью мощности 7,7 мВт/см².

Методика получения штаммов, устойчивых к фотодинамическому воздействию основана на многократном облучении бактериальной культуры, выращенную в течение 24 ч при температуре 37 °С на ГРМ-агаре. Учет результатов проводили путем подсчета числа КОЕ через 24 часа после инкубации при 37 °С. Выжившие (опытные) колонии использовали для подготовки инокулята для следующего экспериментального цикла [10].

Методика выделения и анализа экстрактов каротиноидов из клеток микроорганизма основана на физических и химических свойствах соединений. Культуры выращивали на среде Петровича 3-5 суток при 37 °С. Клетки смывали 2 мл PSB, центрифугировали 10 минут при 5000 об/мин, осадок использовали сразу. К осадку добавляли 10 мл этанола, инкубировали 20 минут при 40 °С, затем центрифугировали 5 минут при 5000 об/мин. Надосадочную жидкость концентрировали в вакууме и экстрагировали смесью этилацетата и 1,7 М NaCl (1:1). Экстракт замораживали для анализа. Для оценки спектров пропускания полученных экстрактов проводили спектрофотометрический анализ с помощью USB4000-UV-VIS (Ocean Optics, США) и волоконно-оптических зондов QR400-7-VIS-NIR (Ocean Optics, США) в диапазоне длин волн 345-800 нм в кювете толщиной 1 мм [11].

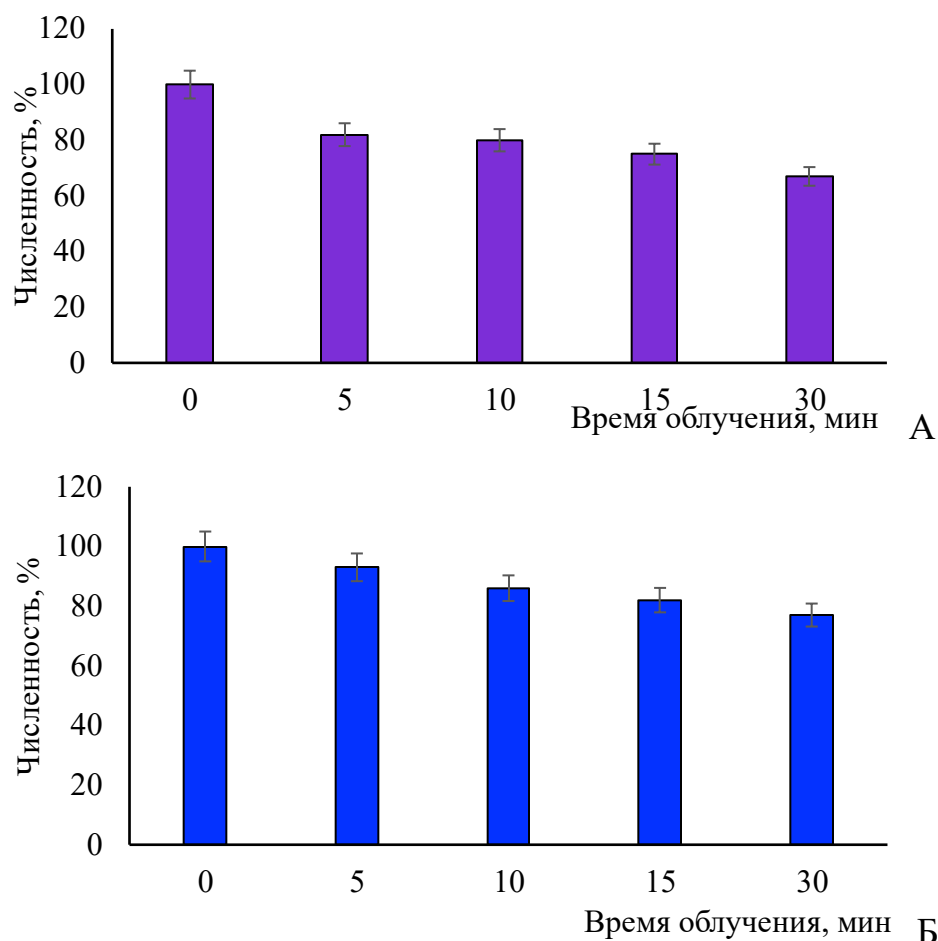
В качестве фотосенсибилизатора использовали водорастворимый катионный пиридилпорфирин цинк-мезо-тетракис [3-N-бутилпиридил] порфирин (Zn-TBut3PyP) в концентрации 0,1 %. В экспериментах *in vitro* воздействие на бактериальные суспензии осуществляли в течение 5, 10, 15 и 30 мин. В экспериментах *in vivo* воздействие осуществляли ежедневно с 10 по 20 день эксперимента, длительность экспозиции составляла 15 мин.

Для исследования *in vivo* производилось моделирование гнойного абсцесса на кафедре оперативной хирургии и топографической анатомии СГМУ им.

В.И. Разумовского в соответствии с методикой, разработанной ранее [12]. Моделирование гнойного абсцесса (МГА) проводили на кафедре СГМУ им. В.И. Разумовского, используя катетер Фоллея с баллоном, заполненным 2 мл физиологического раствора. Баллон погружали в суспензию бактерий (108 мк/мл) для формирования абсцесса. На 5-е сутки катетер удаляли, а наличие МГА подтверждали УЗИ. До начала фотодинамической терапии (ФДВ) выжидали 5 дней. В эксперименте использовались 4 группы животных с разными условиями терапии.

Бакалаврская работа включает содержание, список сокращений, введение, 3 главы (обзор литературы, материалы и методы, результаты исследований и их обсуждение), заключение, выводы и список использованных источников, включающий 65 источников на русском и английском языках. Работа изложена на 43 страницах машинописного текста. Работа проиллюстрирована 8 рисунками.

Основное содержание работы. В ходе проведенных экспериментов была проведена оценка чувствительности клеток *S. aureus* 209 P *in vitro* к действию светодиодного излучения при активации эндогенных порфиринов. На первом этапе исследования проводили оценку чувствительности исследуемой культуры к действию излучения с длиной волны 405 нм (рисунок 1, А). Излучение с длиной волны 405 нм (70 мВт/см^2) подавляло рост клеток *S. aureus* 209 P: на 18% - после 5 мин облучения, на 20% - после 10 мин, на 25% - после 15 мин и на 33% после 30 мин воздействия. Излучение с длиной волны 428 нм и меньшей плотностью мощности - $7,7 \text{ мВт/см}^2$ – обеспечивало менее выраженный антимикробный эффект на бактериальную культуру в условиях *in vitro* (рисунок 1, Б). Снижение численности клеток *S. aureus* 209 P происходило на 23% после 30 мин воздействия.

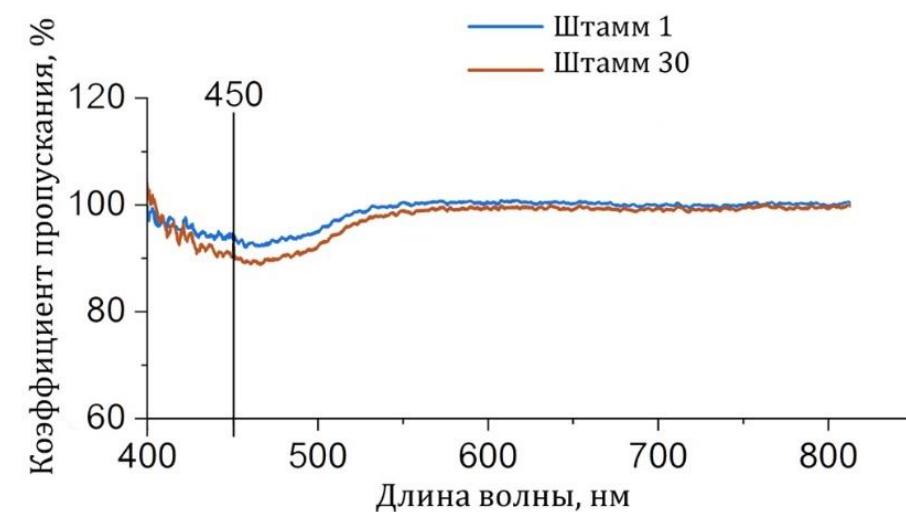


А – при длине волны 405 нм; Б – при длине волны 428 нм

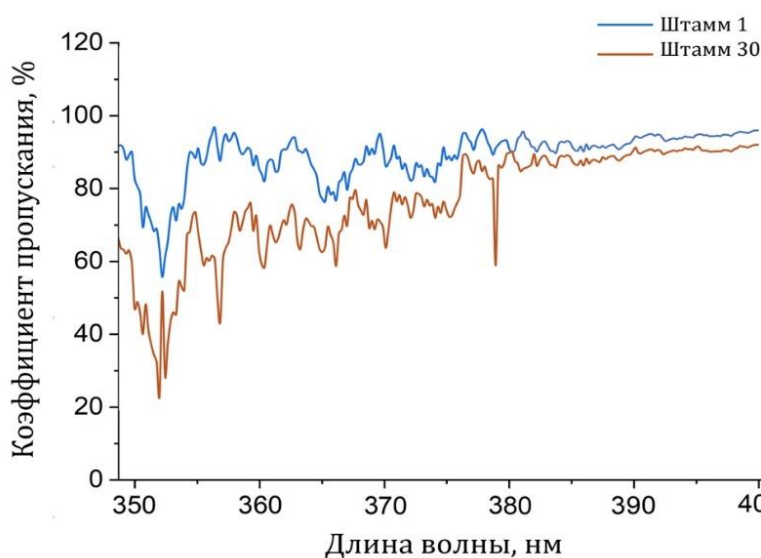
Рисунок 1 – Изменение численности микроорганизмов при воздействии светодиодного излучения

При определении состава каротиноидов в клетках *S. aureus* 209 Р было установлено, что колонии штамма 30 на среде Петровича имели более выраженную золотистую окраску. Для оценки содержания каротиноидов в клетках проводили анализ спектров пропускания экстрактов, полученных из равных по биомассе образцов культур штамма 1 и 30. Полученные спектры имели различия в пределах 10-15% (рисунок 2, А). При этом, значения коэффициента пропускания для штамма 30 были ниже, чем для штамма 1, что свидетельствует о большем содержании веществ в данном образце. Характерный минимум отмечен при длинах волн 450-470 нм, что соответствует максимуму поглощения стафилоксантина [65]. В наших исследованиях была использована 3-5 суточные культуры штаммов 1 и 30, следовательно, в экстрактах могли

присутствовать и предшественники стафилоксантина. Для их выявления проводили измерения спектров пропускания при длинах волн 345-400 нм (рисунок 2, Б).



А



Б

А – измерение в диапазоне длин волн 400-800 нм;

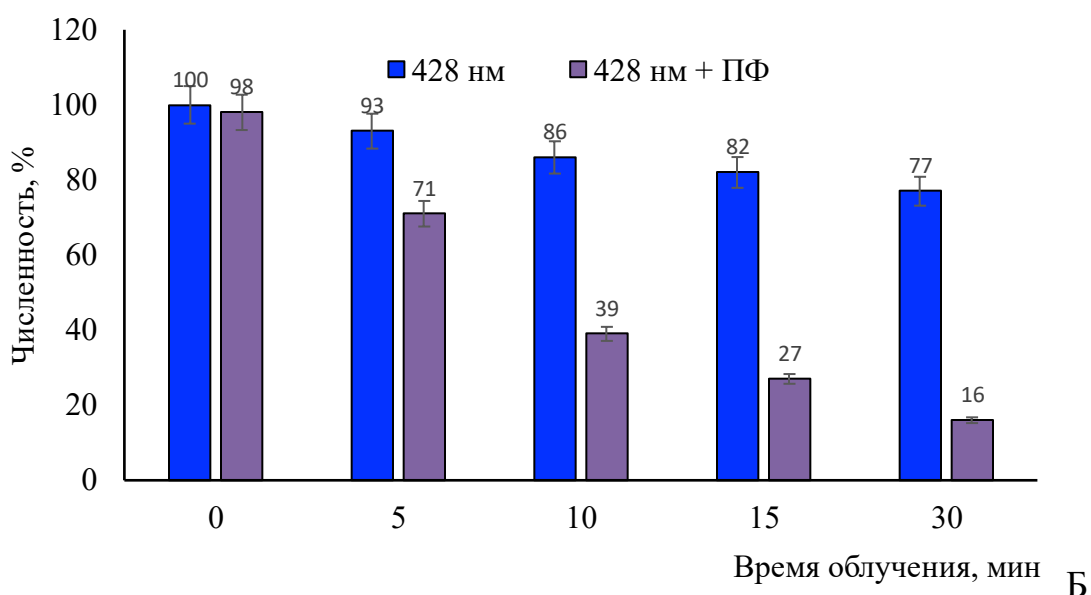
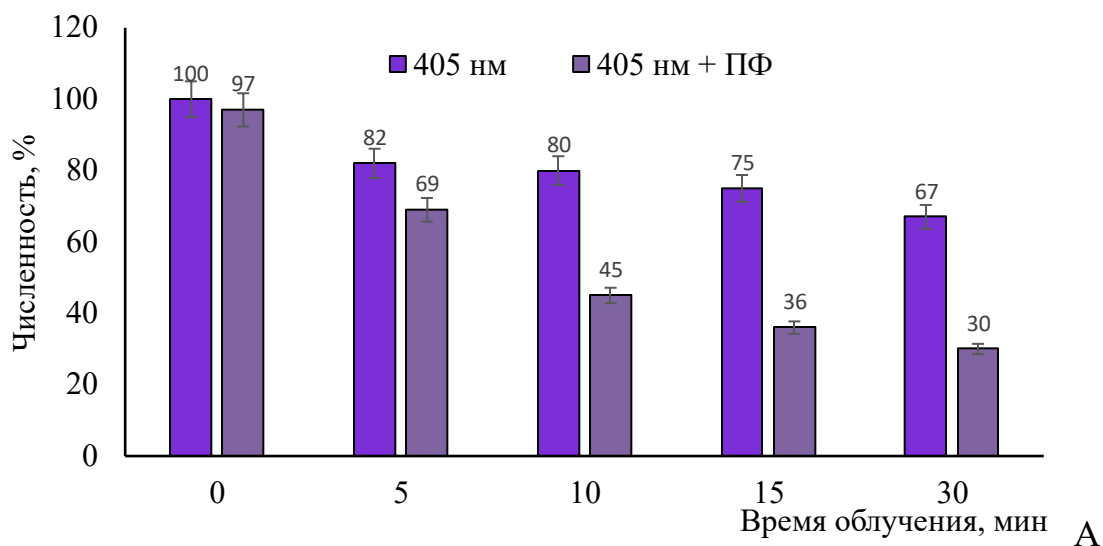
Б – измерение в диапазоне длин волн 345-400 нм

Рисунок 2 – Спектры поглощения экстрактов каротиноидов, выделенных из клеток *S. aureus* 209 P

Изучение спектров пропускания в УФ-спектре показало наличие выраженных пиков при длинах волн 353, 357 и 380 нм для экстрактов,

полученных из культур штамма 30. Исходя из литературных данных [52] можно предположить, что это свидетельствует о присутствии в экстрактах такого вещества как 4,4'-диапонейроспорен, участвующего в образовании стафилоксантина.

Также была произведена оценка чувствительности клеток *S. aureus* 209 P *in vitro* к действию светодиодного излучения при активации эндогенных порфиринов. В данном исследовании был использован цинк-содержащий пиридилпорфирин с максимумом спектра поглощения 432 нм.



А – при длине волны 405 нм; Б – при длине волны 428 нм

Рисунок 3 – Изменение чувствительности микроорганизмов при сочетанном воздействии пиридилпорфирина и светодиодного излучения

При обработке бактериальной культуры Zn-TBut3PyP и последующем облучении фиолетовым (405 нм) светом показано усиление фотодинамического эффекта (рисунок 3, А). Снижение численности *S. aureus* 209 Р после 5 мин воздействия отмечено на 31%, после 15 мин – на 64%, после 30 мин – на 70%. Использование источника синего излучения с максимумом испускания (428 нм) близким к максимуму поглощения Zn-TBut3PyP приводило к выраженному подавлению жизнеспособности *S. aureus* 209 Р (рисунок 3, Б). Показано, что

снижение численности после 5 мин ФДВ составило 29%, после 15 мин – 73%, после 30 мин – 84%.

Исходя из полученных результатов, на следующем этапе исследования оценивали эффективность фотодинамической терапии с использованием фиолетового и синего излучения и 0,1% пиридилпорфирина на скорость и качество заживления моделированного гнойного абсцесса у лабораторных крыс.

При высевах содержимого гнойного абсцесса на питательную среду установлено, что в ходе АФДТ происходит сокращение численности бактерий (рисунок 4).

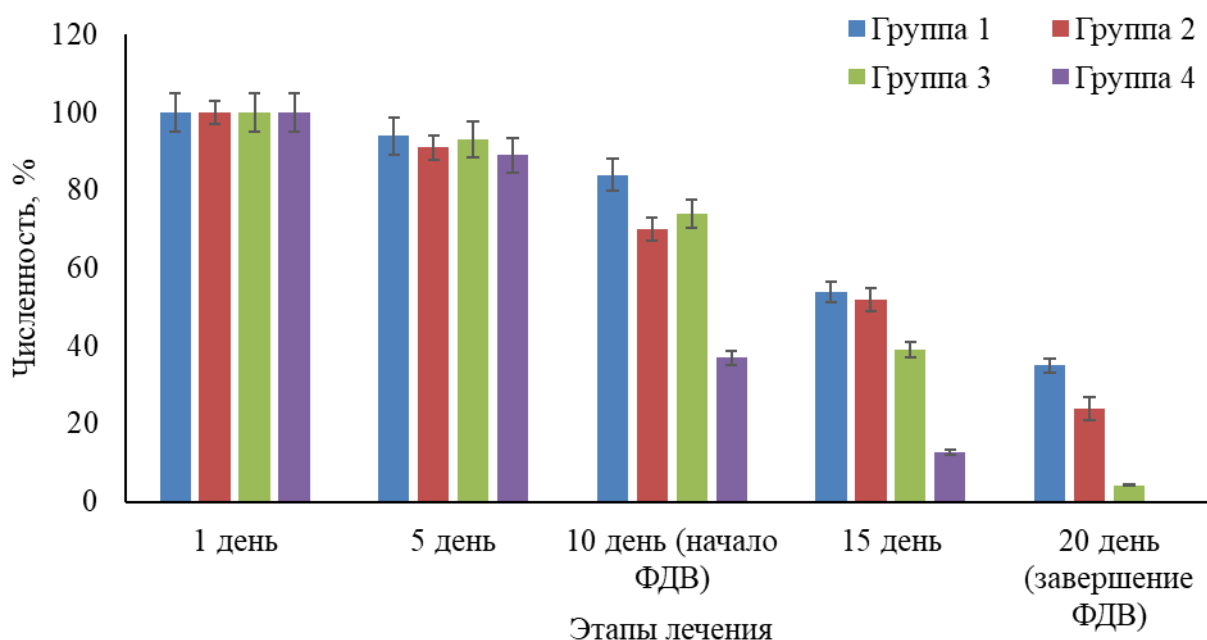


Рисунок 4 – Изменение численности микроорганизмов в области МГА под действием фиолетового (405 нм) излучения и пиридилпорфирина

У животных 1 и 2 групп количество микробных клеток в области МГА снижается на 46-48% по сравнению с 1 днем эксперимента. При этом очевидны различия в обсемененности области ГА у крыс, подвергавшихся ФДТ. Для 3 группы показатели уменьшаются на 95%, а у 4 группы наблюдается полное уничтожение микроорганизмов в полости ГА. Таким образом, за 15 дней терапии происходит полное уничтожение бактерий в области МГА у животных,

получавших комбинированное воздействие с использованием пиридилпорфирина и фиолетового (405 нм).

На рисунке 5 видна динамика изменения численности микроорганизмов в области МГА в ходе проведения эксперимента в зависимости от условий для каждой группы животных от 1 к 20 дню.

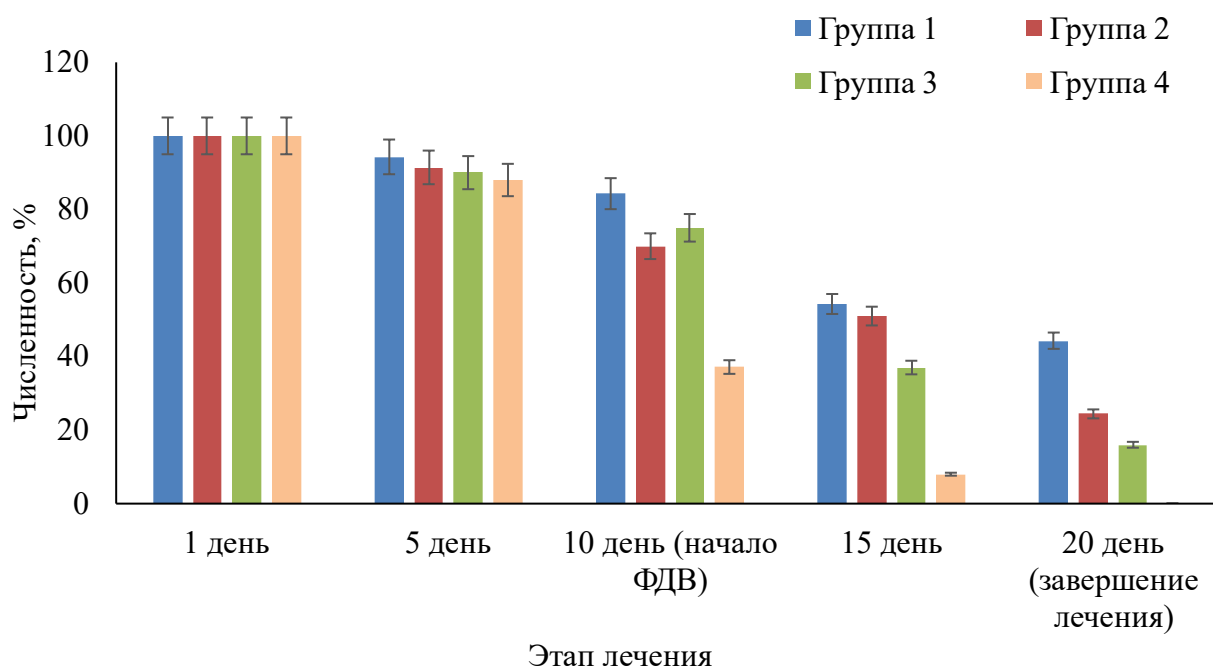


Рисунок 5 – Изменение численности микроорганизмов в области МГА под действием синего (428 нм) излучения и пиридилпорфирина

За весь период лечения у 1 группы животных снижение микроорганизмов происходит на 56%, у 2 группах количество микробных клеток снижается на 76%. Для 3 группы показатели уменьшаются на 35%, а у 4 группы наблюдается полное уничтожение микроорганизмов в полости МГА.

При сравнении эффективности двух источников излучения небольшие различия заметны только к 15 дню эксперимента (5 день проведения ФДВ). Синее (428 нм) излучение при небольшой плотности мощности обеспечивает селективность взаимодействия с молекулами фотосенсибилизатора, однако фиолетовое (405 нм) излучение, по всей видимости, позволяет дополнительно активировать эндогенные порфирины в клетках микроорганизмов.

Заключение: В данном исследовании была изучена роль эндогенных и экзогенных порфиринов в антимикробном фотодинамическом воздействии светодиодного фиолетового (405 нм) излучения и синего (428 нм) излучения. Применение фотосенсибилизаторов в АФДТ представляет собой эффективный метод борьбы с бактериальными инфекциями в экспериментах *in vivo*. После многократного облучения бактериальных клеток наблюдались отличия в окраске между контрольной и экспериментальной группой, что свидетельствует о наличии каротиноидов в клетках.

Фиолетовое (405 нм) излучение снижало численность микроорганизмов содержание каротиноидов, однако синие (428 нм) излучение показало менее выраженный антимикробный эффект. Эксперименты *in vitro* продемонстрировали, что светодиодное излучение с длиной волны 405 нм в сочетании с пиридилпорфирином существенно повышает эффективность ФДВ. Уже через 15 минут воздействия наблюдалось снижение численности *S. aureus* на 64%, а через 30 минут – на 70%. При излучении с длиной волны 428 нм особые эффекты не наблюдаются, однако при сочетанном воздействии с пиридилпорфирином эффективность возрастает. В экспериментах *in vivo* было установлено, что в применение АФДТ приводит к полному уничтожению бактериальных клеток. У животных 4 группы, подвергавшихся комбинированной терапии снижение численности микроорганизмов уже наблюдалось к 15 дню эксперимента.

Выводы: 1. Установлено, что клетки *S. aureus* 209 P на 10-15% более чувствительны к действию фиолетового (405 нм) излучения, чем к действию синего (428 нм) излучения *in vitro*.

2. Показано, что коэффициент пропускания экстракта культуры *S. aureus* 209 P, подвергшейся 30 циклам воздействия с помощью фиолетового (405 нм), при длинах волн 345-470 нм на 5-20% ниже по сравнению с контрольной культурой, что свидетельствует о повышенном содержании в клетках каротиноидов.

3. Анализ чувствительности клеток *S. aureus* 209 Р к комбинированному действию цинк-содержащего пиридилпорфирина в качестве экзогенного фотосенсибилизатора при использовании как фиолетового (405 нм), так и синего (428 нм) излучения показал усиление фотодинамического эффекта на 10-35%.

4. Выявлено, что фотодинамическая терапия моделированных гнойных абсцессов у лабораторных животных приводит к полному уничтожению микробных клеток к 15 дню воздействия с использованием светодиодного излучения и цинк-содержащего пиридилпорфирина, при этом существенных различий в эффективности фиолетового (405 нм) и синего (428 нм) излучения отмечено не было.

Список использованных источников

1 Laux, C. *Staphylococcus aureus* colonization of the human nose and interaction with other microbiome members / C. Laux, A. Peschel, B. Krismer // Microbiology spectrum. – 2019. – V. 7, N 2. – P. 1-12.

2 Pal, M. *Staphylococcus aureus*, an important pathogen of public health and economic importance: a comprehensive review / M. Pal, K. P. Gutama, T. Koliopoulos // Journal of emerging environmental technologies and health protection. – 2021. – V. 4, N 2. – P. 17-32.

3 French, G. L. The continuing crisis in antibiotic resistance / G. L. French // International journal of antimicrobial agents. – 2010. – V. 36, N 3. – P. 53-57.

4 Современные подходы к проведению антимикробной и противовоспалительной фотодинамической терапии в оториноларингологии / А. С. Лапченко [и др.] // Вестник оториноларингологии. – 2014. – Т. 1. – С. 60-63.

5 Antimicrobial photodynamic therapy / S. Rajesh [et al.] // Journal of Indian society of periodontology. – 2011. – V. 15, N 4. – P. 323-327.

6 The role of the source in antimicrobial photodynamic therapy / M. Piksa [et al.] // Chemical society reviews. – 2023. – V. 5, N 52. – P. 1697-1722.

7 Тучина, Е. С. Некоторые аспекты антимикробного фотодинамического воздействия / Е. С. Тучина // Изв. Сарат. ун-та. Нов. сер. Сер.: Химия. Биология. Экология. – 2022. – Т. 22, № 1. – С. 33-46.

8 Питательные среды для выявления стафилококков в клинической и санитарной микробиологии / А. П. Шепелин [и др.] // Биопрепараты. – 2015. – Т. 4, № 2. – С. 39-43.

9 Красникова, Л. В. Общая и пищевая микробиология: Учеб. Пособие. Часть I / Л. В. Красникова, П. И. Гунькова. – СПб.: Университет ИТМО, 2016. – 135 с.

10 Тучина Е. С., Каневский М. В., Эль-Хих А. Н., Сливина Ю. И. Динамика формирования у *Staphylococcus aureus* толерантности к фиолетовому (405 нм) светодиодному излучению при многократном воздействии / Е. С. Тучина [и др.] // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология. – 2024. – Т. 24, № 2. – С. 196-201.

11 Чечета, О. В. Методика определения каротиноидов методом хроматографии в тонком слое сорбента // О. В. Чечета, Е. Ф. Сафонова, А. И. Сливкин // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2008. – Т. 8, №2. – С. 320-326.

12. Пат. 2601378 Российская Федерация. Способ моделирования абсцесса мягких тканей / В. В. Алипов, А. И. Урусова. – Заявка № 2015120118/14 от 27.05.2015; опубл. 10.11.2016, Бюл. № 31.

