

ПЕРМЕАБИЛИЗАЦИЯ МЕМБРАН КЛЕТОК *Pseudomonas aeruginosa* ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ УДАРНЫХ ВОЛН

© 2024 г. С.Н. Летута*, А.Т. Ишемгулов*., О.К. Давыдова*, А.Н. Никиян*, М.Е. Григорьев*

*Оренбургский государственный университет, просп. Победы, 13, Оренбург, 460018, Россия

#E-mail: azamat.ischemgulov@yandex.ru

Поступила в редакцию 20.10.2023 г.

После доработки 20.10.2023 г.

Принята к публикации 06.12.2023 г.

Исследовано влияние ударных акустических волн на проницаемость мембран грамотрицательных бактерий *P. aeruginosa* для анионного фотосенсибилизатора эритрозина. Ударные волны генерировались путем быстрого локального нагрева среды, возникающего в ходе безызлучательной релаксации высоких электронно-возбужденных состояний молекул фотосенсибилизатора, заселяемых лазерным импульсом высокой плотности мощности. Показано, что под воздействием ударных волн увеличивается проницаемость мембран бактерий, эритрозин проникает внутрь клеток, что сопровождается повышением эффективности фотодинамического действия на микроорганизмы.

Ключевые слова: ударные волны, пермеабилзация мембран клеток, антимикробная фотодинамическая терапия.

DOI: 10.31857/S0006302924050068, **EDN:** MKIRZT

Антимикробная фотодинамическая терапия (аФДТ), не допускающая микробной резистентности, — важная составляющая современной стратегии борьбы с патогенными микроорганизмами. Фотодинамический эффект основан на высокой цитотоксичности активных форм кислорода, генерируемых фотосенсибилизаторами (ФС) после облучения светом, длина волны которого совпадает со спектром поглощения. В качестве ФС используют химически стабильные соединения, нетоксичные в темновых реакциях, но эффективно генерирующие активные формы кислорода при активации светом. Наиболее известные активные формы кислорода — синглетный кислород и анион-радикалы — действуют на грамположительные и грамотрицательные бактерии, некоторые виды грибов и вирусов, а также разрушают или предотвращают образование микробных биопленок [1–5]. Эффективность аФДТ зависит от характера взаимодействия ФС с клетками-мишенями и их способности проникать внутрь бактерий. В ряде работ показано [6–8], что проникновение ФС в клетки многократно повышает результативность аФДТ и, фактически, является обязательным условием фотодинамического действия.

Плазматические мембраны состоят из липидных бислоев, которые практически непроницаемы для заряженных молекул ФС. Для лучшего проникновения ФС в бактериальные клетки используют различные приемы, в том числе временную пермеабилзацию клеток [9], что в совокупности с последующей фотодинамической обработкой резко повышает эффективность фотодеструкции микробных образований. Добавим к сказанному, что увеличение проницаемости мембран востребовано не только в аФДТ, но и в генной инженерии и терапии для доставки в клетки плазмид, олигонуклеотидов и других макромолекул. Поэтому поиск методов увеличения проницаемости мембран — весьма актуальная задача.

Известны приемы пермеабилзации мембран с помощью ультразвука [10, 11], электропорации [12] и др. В работе [13] продемонстрирована возможность временного увеличения проницаемости мембран с помощью ударных волн. Для генерации ударных волн используют различные устройства — ударные трубки, ударно-волновые литотриптеры [14] или короткие лазерные импульсы, включая лазерную абляцию мишеней [15, 16]. Не все из перечисленных методов изменения проницаемости мембран клеток представляют собой совершенные технологии, в равной степени удобные для практического применения даже в условиях *in vitro*. В этой связи каждый из

Сокращения: аФДТ — антимикробная фотодинамическая терапия, ФС — фотосенсибилизатор, КОЕ — колониеобразующие единицы.

альтернативных приемов повышения проникновения ФС в клетки заслуживает внимания, что особенно актуально для грамотрицательных бактерий, более устойчивых к фотодинамическому действию [2].

В работе представлены результаты исследования проникновения анионного ФС эритрозина внутрь грамотрицательных бактерий *Pseudomonas aeruginosa* после воздействия ударных волн, генерируемых путем быстрого локального нагрева среды. Локальный нагрев осуществлялся с помощью коротких (10 нс) импульсов сфокусированного лазерного излучения, возбуждающих молекулы-термосенсибилизаторы, в роли которых выступал тот же эритрозин. Квантовый выход интеркомбинационной конверсии у молекул эритрозина близок к единице, поэтому при концентрации красителя 0.5 мМ уже при плотности мощности P возбуждения 1–2 МВт/см² примерно через 2 нс после начала возбуждения практически все молекулы в растворе переходят в триплетное состояние. Полосы поглощения из основного и триплетного состояний в красителях сильно перекрываются, и оставшаяся часть световой энергии поглощается молекулами в триплетном состоянии с заселением высоких электронно-возбужденных состояний [17–21]. При плотности мощности возбуждения выше 5–7 МВт/см² «включается» канал поглощения из первого возбужденного синглетного состояния с заселением высоких синглетных уровней энергии. Время жизни высоких электронно-возбужденных состояний, как правило, не превышает единиц пикосекунд, а основной канал релаксации — безызлучательная внутренняя конверсия с передачей тепла окружению [22–24]. При мощном импульсном возбуждении молекул эритрозина обеспечивается очень быстрый локальный нагрев среды с генерацией ударных акустических волн. Учитывая, что эритрозин является эффективным генератором активных форм кислорода, пермеабиллизацию мембран бактерий с последующим проникновением красителя в клетки оценивали сравнивая выживаемость бактерий в результате фотодинамической обработки до и после воздействия ударных волн.

ЭКСПЕРИМЕНТ

Материалы. Для исследований использовали суточные культуры клеток *Pseudomonas aeruginosa* (коллекция Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН). Перед облучением бактерии переносились в физиологический раствор (0.9%-й водный раствор NaCl). Плотность полученной суспензии стандартизировали фотометрически с помощью спектрофотометра Immunochem-2100 (HighTechnology Inc., США) на дли-

не волны 600 нм. Для оценки выживаемости бактерий, обработанных видимым светом (532 нм) до и после воздействия ударными волнами, применяли метод подсчета колониеобразующих единиц (КОЕ). Количество КОЕ определяли через 24 ч роста на цетримидном агаре при температуре 37°C. Величина КОЕ до воздействия ударных волн, добавления красителя и облучения составляла $(30.0 \pm 5.3) \times 10^6$ /мл.

Возбуждение и регистрация ударных волн. Экспериментальная установка для генерации и регистрации ударных волн в растворах красителей описана в работе [25]. Растворы помещали в прямоугольную кварцевую кювету сечением 5×20 мм² и облучали через ее торцевую стенку. Источником возбуждения служил импульсно-периодический YAG:Nd-лазер (вторая гармоника $\lambda = 532$ нм, длительность импульса 10 нс, Solar LS, Беларусь).

С помощью цилиндрической собирающей линзы лазерный луч фокусировался в перетяжку с апертурой 3.5×0.35 мм². Плотность мощности возбуждения была максимальна в фокусе и регулировалась в пределах 0.1–10 МВт/см². В области фокусировки происходил локальный нагрев и возникали ударные волны. Термосенсибилизатором служил анионный ксантеновый краситель эритрозин, концентрация которого в растворах составляла 0.25–0.50 мМ. Часть света после перетяжки проникала в раствор (рис. 1а). При плотности мощности 10 МВт/см² и концентрации красителя 0.5 мМ возбуждающее излучение проникало вглубь раствора на расстояние менее 10 мм.

Вдоль перетяжки линзы (или параллельно ей на регулируемом расстоянии) пропускали зондирующий луч диаметром 1 мм от невозмущающего маломощного (менее 1 мВт) He–Ne-лазера. Прошедший сквозь кювету луч попадал на входную щель монохроматора МДР-41 (ОКБ «Спектр», Россия). Интенсивность прошедшего луча измеряли с помощью фотоэлектронного умножителя ФЭУ-84.

Эритрозин в невозбужденном состоянии не поглощает свет длины волны 632 нм. После возбуждения раствора излучением YAG:Nd-лазера (532 нм) образуются долгоживущие триплетные состояния молекул красителя, происходит локальный нагрев среды и возникают ударные волны. Измеряя пропускание зондирующего луча на разном расстоянии от перетяжки, можно зарегистрировать наведенное триплет-триплетное поглощение и рефракцию зондирующего луча при его пересечении распространяющейся акустической волной (рис. 1б).

На рис. 1б представлено изменение интенсивности зондирующего луча на расстоянии 5 мм от перетяжки. После окончания возбуждающего

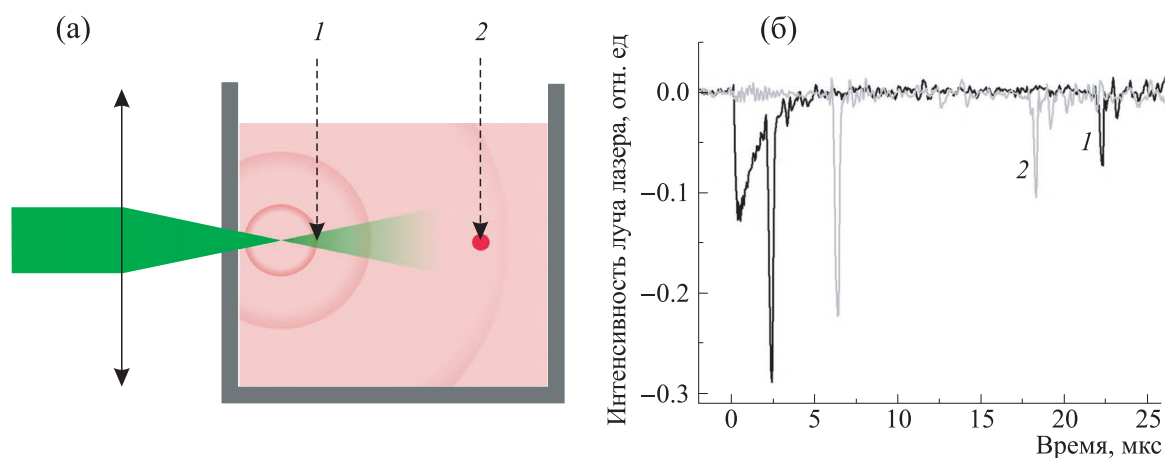


Рис. 1. (а) — Схема облучения образцов в кювете. (б) — Кинетические кривые пропускания зондирующего луча He–Ne-лазера на разных расстояниях от перетяжки возбуждающего пучка: кривая 1 — на расстоянии 5 мм от перетяжки, кривая 2 — на расстоянии 11.4 мм от перетяжки.

импульса интенсивность прошедшего луча уменьшается и затем за время около 5 мкс восстанавливается до первоначального значения. Уменьшение пропускания обусловлено наведенным триплет-триплетным поглощением молекул эритрозина. Время жизни триплетных состояний красителя в физрастворе при нормальных условиях составляет около 3 мкс. Резкий провал в момент времени около 2.5 мкс на фоне кривой наведенного поглощения возникает из-за рефракции зондирующего луча и его смещения от центра входной щели монохроматора в момент пересечения распространяющейся акустической волны. На рис. 1б в области 22.5 мкс виден еще один провал. Это результат рефракции зондирующего луча при его пересечении волной, отраженной от задней стенки кюветы.

На этом же рисунке представлено пропускание зондирующего луча на расстоянии 11.4 мм от перетяжки линзы. На таком расстоянии уже нет наведенного поглощения, поскольку в эту область кюветы не проникает возбуждающий свет и нет молекул в триплетном состоянии, но уверенно регистрируется ударная волна (на шкале времени около 6.5 мкс), возникающая в перетяжке линзы и распространяющаяся в среде. Видны также отраженные волны (в интервале 18–20 мкс) от разных поверхностей кюветы. По известному времени между моментами пересечения зондирующего луча прямой и отраженной волной была определена скорость волны, которая составила 1495 ± 30 м/с, что совпадает со скоростью звука в физиологическом растворе. Таким образом, из-за трехмерной формы кюветы поле давления в пробирке неоднородно, и на бактерии в растворе действуют прямые и отраженные акустические волны.

Для определения угла преломления луча была построена кривая распределения интенсивности излучения по сечению зондирующего пучка с шагом 50 мкм (диаметр пучка 1 мм). По уменьшению интенсивности света из-за преломления луча в момент прохождения ударной волны оценивали расстояние, на которое луч отклонялся от центра входной щели монохроматора. На расстоянии 300 мм от кюветы отклонение луча составляло от 0.22 ± 0.02 мм до 0.31 ± 0.03 мм, что соответствует углам отклонения от $3'$ до $6'$. По известному отклонению луча от начальной траектории определяли изменение показателя преломления света.

Задача об измерении показателя преломления воды при высоких динамических давлениях и связи коэффициента преломления с плотностью жидкости и давлением решена в работе [27]. Используя эмпирическую формулу связи показателя преломления n с плотностью ρ воды ($n = 1.332 + 0.322(\rho - 1)$), оценили изменение плотности среды при прохождении прямых и отраженных волн в 1.017 ± 0.008 и 1.011 ± 0.005 г/см³ соответственно (в отсутствие возмущений плотность раствора составляла 1.005 г/см³), а соответствующие пиковые давления — 26.4 ± 5.3 и 13.1 ± 2.6 МПа. Результаты измерений сильно зависят от колебаний энергии лазерного импульса, генерирующего ударные волны в каждом эксперименте.

Фотодинамическая обработка бактерий. Квантовый выход в триплетное состояние в молекулах эритрозина в воде близок к единице [28] и этот краситель обладает выраженной фотодинамической активностью [29, 30]. При этом аФДТ существенно возрастает, если ФС проникает внутрь клеток [6–8]. Мы использовали это обстоятельство для оценки изменения выживаемости

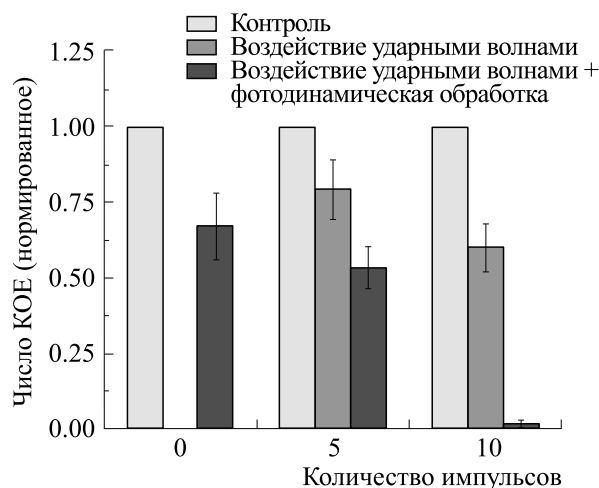


Рис. 2. Изменение числа колониеобразующих единиц *P. aeruginosa* после воздействия на суспензию 0, 5 и 10 сфокусированных импульсов YAG:Nd-лазера и последующего облучения галогенной лампой в течение 5 мин.

бактерий вследствие повышения проницаемости клеточных мембран под воздействием ударных волн. После воздействия на бактерии 5 или 10 ударными волнами на расстоянии 15 мм от перетяжки (на рис. 1 область обозначена кружком) отбирали контрольную пробу. На таком расстоянии от области фокусировки возбуждающего луча исключается термическое и фотодинамическое воздействие на клетки. Затем раствор облучали в течение 5 мин коллимированным пучком света от галогенной лампы через светофильтр СЗС-22 с плотностью мощности около 100 мВт/см^2 в полосе поглощения эритрозина. Сравнивали значения КОЕ бактерий после фотодинамической обработки до и после воздействия на них ударных волн (рис. 2).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 2 показаны гистограммы величин КОЕ: контрольной суспензии бактерии с красителем, той же суспензии после фотодинамической обработки, после воздействия 5 и 10 ударными волнами и суспензии бактерий с красителем после воздействия 5 и 10 ударными волнами с последующей фотодинамической обработкой в течение 5 мин.

Как видно из гистограмм на рис. 2, после облучения суспензии с бактериями в присутствии эритрозина в течение 5 мин светом в полосе поглощения красителя с плотностью мощности около 100 мВт/см^2 , даже без воздействия на микроорганизмы ударных волн, имеет место фотодинамический эффект. Количество КОЕ уменьшается более чем на 30%, что свидетельствует о

высокой фотодинамической активности эритрозина по отношению к бактериям *P. aeruginosa*.

После воздействия 5 ударных волн КОЕ снижается вследствие деструктивного действия ударных волн на бактерии (рис. 2). Ранее было показано, что ударные волны способны разрушать мембраны клеток [31]. Однако наиболее интересный результат в контексте задачи настоящей работы — повышение эффективности аФДТ после воздействия на клетки ударными волнами. Фотодинамическая обработка растворов после воздействия 5 ударных волн приводит к дополнительному сокращению жизнеспособности микроорганизмов. Еще более выражено данный эффект проявляется после воздействия на клетки 10 ударных волн. Как следует из рис. 2, выживаемость бактерий после аФДТ составляет лишь 2%. В отдельных экспериментах при последовательном воздействии на клетки волна + облучение жизнеспособность утрачивали все микроорганизмы. Объяснить данный экспериментальный факт можно только изменением проницаемости плазматической мембраны под воздействием ударных волн, проникновением эритрозина внутрь клеток и существенным повышением эффективности аФДТ.

Механизм пермеабилзации клеток под воздействием ударных волн пока окончательно неясен. Авторы работы [32] показали, что проницаемость клеточной мембраны зависит от профиля ударной волны. Условием повышения проницаемости мембран названа соизмеримость ширины волны на полувысоте с размерами клеток. Поры образуются на мембране при возникновении резких градиентов давления. Деформация происходит из-за неравномерного распределения

давления и локального разрыва прикреплений мембраны к цитоскелету в областях высокого давления в клетках.

В работе [33] временное увеличение проницаемости клеток обосновано возникновением силы сдвига на плазматической мембране, вызываемой ударной волной. В жидкости *in vitro* клетки движутся в направлении распространения волны, и между клеткой и жидкой фазой возникают напряжения сдвига. Сила, действующая на мембраны, увеличивается пропорционально разности скоростей движения клеток и жидкости. Сделан вывод о том, что доминирующим фактором повышения проницаемости мембран живых клеток является импульс ударной волны (т.е. давление, интегрированное во времени), а не пиковое давление.

Если принять этот механизм за основу, то рост количества пермеабилizованных клеток с увеличением числа ударных волн в наших экспериментах, по-видимому, связан с тем, что клетки имеют разное «исходное» количество мембранных пор, увеличивающихся при возникновении сил сдвига на текучей плазматической мембране при каждом воздействии ударной волны. Анионный краситель эритрозин проникает в клетки только при определённых размерах пор на мембране. При этом следует учитывать, что на бактерии действуют как прямые волны, так и волны, отражённые от разных поверхностей, каждая из которых даёт вклад в увеличение проницаемости мембран.

Анализ литературных данных о временном изменении проницаемости мембран клеток под действием ударных волн, инициированных в жидких средах разными способами, указывает на зависимость процесса от типа клеточной линии. Эффективность пермеабилзации зависит от плотности внутриклеточных органелл, подвижности (текучести) мембран клеток и от стадии клеточного цикла. Мы использовали клетки на стадии экспоненциальной фазы роста. Неизменной остаётся возможность повышения результативности аФДТ за счёт проникновения ФС в бактериальные клетки после их предварительной обработки ударными волнами.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предварительная пермеабилзация мембран ударными волнами значительно усиливает фотодинамическое воздействие сенсibilизатора на бактериальные клетки. В зависимости от способа возбуждения сенсibilизатор может служить одновременно и фотодинамическим агентом, и тепловым источником, генерирующим ударные волны. Ударные волны способны уничтожать клетки вне зависимости от глубины проникновения света и кислорода в среду. Повышение эффективно-

сти фотодинамического действия после предварительной пермеабилзации мембран, безусловно, расширит сферу применения аФДТ, что особенно актуально для грамотрицательных бактерий.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России (проект № FSGU-2023-0003).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, связанных с изложенными в статье данными.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания собственных исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hamblin M. R. Antimicrobial photodynamic inactivation: a bright new technique to kill resistant microbes. *Curr. Opin. Microbiol.*, **33**, 67 (2016). DOI: 10.1016/j.mib.2016.06.008
2. Huang L., Dai T., and Hamblin M. R. Antimicrobial photodynamic inactivation and photodynamic therapy for infections. *Methods Mol. Biol.*, **635**, 155–173 (2010). DOI: 10.1007/978-1-60761-697-9_12
3. Svyatchenko V. A., Nikinov S. D., Mayorov A. P., Gelfond M. L., and Loktev V. B. Antiviral photodynamic therapy: Inactivation and inhibition of SARS-CoV-2 *in vitro* using methylene blue and Radachlorin. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, **33**, 102112 (2021). DOI: 10.1016/j.pdpdt.2020.102112
4. Lago A. D. N., Fortes A. B. C., Furtado G. S., Menezes C. F. S., and Goncalves L. M. Association of antimicrobial photodynamic therapy and photobiomodulation for herpes simplex labialis resolution: case series. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, **32**, 102070 (2020). DOI: 10.1016/j.pdpdt.2020.102070
5. Fabio G. B., Martin B. A., Dalmolin L. F., and Lopez R. F. V. Antimicrobial photodynamic therapy and the advances impacted by the association with nanoparticles. *J. Drug Deliv. Sci. Tech.*, **80**, 104147 (2023). DOI: 10.1016/j.jddst.2022.104147
6. Ochsner M. Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours. *J. Photochem. Photobiol. B*, **39** (1), 1–18 (1997). DOI: 10.1016/s1011-1344(96)07428-3
7. Кустов А. В., Гарасько Е.В., Белых Д. В., Худяева И. С., Старцева О. М., Макаров В. В., Стрельников А. И. и Березин Д. Б. Фотосенсиби-

- лизаторы хлоринового ряда для антимикробной фотодинамической терапии. *Успехи современного естествознания*, **12** (2), 263 (2016). DOI: 10.17513/use.36297
8. O'Neill J. *Tackling a global health crisis: initial steps. The Review on Antimicrobial Resistance* (Review on antimicrobial resistance, London, 2015). <https://amr-review.org/sites/default/files/Report-52.15.pdf>
9. Hapala I. Breaking the Barrier: Methods for reversible permeabilization of cellular membranes *Crit. Rev. Biotechnol.*, **17**, 105 (1997). DOI: 10.3109/07388559709146609
10. Liu, J., Lewis T. N., and Prausnitz M. R. Non-invasive assessment and control of ultrasound-mediated membrane permeabilization. *Pharm. Res.*, **15**, 918 (1998). DOI: 10.1023/a:1011984817567
11. Huber P. E. and Pesterer P. *In vitro* and *in vivo* transfection of plasmid DNA in the Dunning prostate tumor R3327-AT1 is enhanced by focused ultrasound. *Gene Ther.*, **7**, 1516 (2000). DOI: 10.1038/sj.gt.3301242
12. Ho S. Y. and Mittal G. S. Electroporation of cell membranes: a review. *Crit. Rev. Biotechnol.*, **16**, 349 (1996). DOI: 10.3109/07388559609147426
13. Lauer U., Burgelt E., Squire Z., Messmer K., Hofschneider P. H., Gregor M. and Delius M. Shock wave permeabilization as a new gene transfer method. *Gene Ther.*, **4**, 710–715 (1997). DOI: 10.1038/sj.gt.3300462
14. Gambihler S., Delius M., and Ellwart J. W. Permeabilization of the plasma membrane of L1210 mouse leukemia cells using lithotripter shock waves. *J. Membr. Biol.*, **141**, 267–275 (1994). DOI: 10.1007/BF00235136
15. Lee, S. and Doukas A. G. Laser-generated stress waves and their effects on the cell membrane. *J. Sel. Top. Quant.*, **5**, 997–1003 (1999). DOI: 10.1109/2944.796322
16. Mulholland S. E., Lee S., McAulie D. J., and Doukas A. G. Cell loading with laser-generated stress waves: the role of the stress gradient. *Pharm. Res.*, **16**, 514–518 (1999). DOI: 10.1023/a:1018814911497
17. Alfimov M. V., Batekha I. G., Shek Yu. B., and Gerko V. I. Triplet-triplet absorption and energy transfer from high triplet states. *Spectrochimica Acta. Part A: Mol. Spectr.*, **27**, 329–341 (1971). DOI: 10.1016/0584-8539(71)80039-9
18. Летохов В. С. *Нелинейные селективные фотопроцессы в атомах и молекулах* (Наука, М., 1983).
19. Nickel B. and Roden G. Stepwise two-photon excitation of tetracene; fluorescence from upper excited singlet states. *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.*, **81** (3), 281–285 (1977). DOI: 10.1002/bbpc.19770810308
20. Tobita S., Kaisu Y., Kobayashi H., and Tanaka I. Study of higher excited singlet states of zinc(II)-tetraphenylporphyrin. *J. Chem. Phys.*, **81** (7), 2962–2969 (1984). DOI: 10.1063/1.448046
21. Orner G. C., Topp M. R. Biphotonic laser excitation of upper singlet state fluorescence in organic dyes. *Chem. Phys. Lett.*, **36** (5), 295–300 (1975). DOI: 10.1016/0009-2614(75)80240-5
22. Lin H.-B. and Topp M. R. Low quantum-yield molecular fluorescence. Aromatic hydrocarbons in solution at 300 K. *Chem. Phys. Lett.*, **46** (2), 251–255 (1977). DOI: 10.1016/0009-2614(77)80309-6
23. Ermolaev V. L. Ultrafast nonradiative transitions between higher excited states in organic molecules *Russ. Chem. Rev.*, **70**, 471–490 (2001). DOI: 10.1070/RC2001v070n06ABEH000657
24. Nagaoka C., Fujita M., Takemura T., and Baba H. Fluorescence from an upper excited state of o-hydroxybenzaldehyde in the vapor phase. *Chem. Phys. Lett.*, **123** (6), 489–492 (1986). DOI: 10.1016/0009-2614(86)80048-3
25. Letuta S. N., Pashkevich S. N., Ishemgulov A. T., and Nikiyan A. N. Inactivation of planktonic microorganisms by acoustic shock waves. *Russ. J. Phys. Chem. A*, **95** (4), 848–854 (2021). DOI: 10.1134/S0036024421040142
26. Letuta S. N., Ishemgulov A. T., Dorofeev D. V., and Tsurko D. E. Kinetics of induced absorption of multi-atomic molecules during two-photon excitation. *Bull. of the Lebedev Physics Institute*, **50**, 54–59 (2023). DOI: 10.3103/S1068335623130055
27. Yadav H. S., Murty D. S., Verma S. N., Sinha K. H. C., Gupta B. M., and Chand D. Measurement of refractive index of water under high dynamic pressures. *J. Appl. Phys.*, **44**, 2197–2200 (1973). DOI: 10.1063/1.1662536
28. Rohatgi-Mukherjee K. K. *Fundamentals of photochemistry* (Wiley Eastern Ltd., New Delhi, Bangalore, Bombay, 1978). DOI: 10.1002/bbpc.19790830824
29. Tokubo L. M., Rosalen P. L., and Cássia J. Antimicrobial effect of photodynamic therapy using erythrosine/methylene blue combination on *Streptococcus mutans* biofilm. *Photodiagn. Photodynam. Ther.*, **23**, 94–98 (2018). DOI: 10.1016/j.pdpdt.2018.05.004
30. Fracalossi C., Nagata J. Y., Pellosi D. S., Terada R., Hioka N., Baesso M. L., Sato F., Rosale P. L., Caetano W., and Fujimaki M. Singlet oxygen production by combining erythrosine and halogen light for photodynamic inactivation of *Streptococcus mutans*. *Photodiagn. Photodynam. Ther.*, **15**, 127–132 (2016). DOI: 10.1016/j.pdpdt.2016.06.011
31. Letuta S. N., Ishemgulov A. T., Nikiyan A. N., Razdobreev D. A., Galaktionova L. V., Dorofeev D. V., and Tsurko D. E. Mechanisms of damage in *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus* upon pulse photoexcitation of molecular sensitizers. *Biophysics*, **67**, 419–426 (2022). DOI: 10.1134/S0006350922030137
32. Ito Y., Veyssset D., Kooi S. E., Martynowych D., Nakagawa K., and Nelson K. A. Interferometric and fluorescence analysis of shock wave effects on cell membrane. *Communications Physics*, **3** (2020). DOI: 10.1038/s42005-020-0394-3
33. Kodama T., Hamblin M. R., and Doukas A. G. Cytoplasmic molecular delivery with shock waves: importance of impulse. *Biophysical Journal*, **79**, 1821–1832 (2000). DOI: 10.1016/S0006-3495(00)76432-0

Shock Wave-induced Cell Membrane Permeabilization of *Pseudomonas aeruginosa*

S.N. Letuta*, A.T. Ishemgulov*, O.K. Davydova*, A.N. Nikiyan*, and M.E. Grigoriev*

**Orenburg State University, prosp. Pobedy 13, Orenburg, 460018 Russia*

Effects of acoustic shock waves on membrane permeability of Gram-negative bacteria *P. aeruginosa* for an anionic photosensitizer, such as erythrosine, were studied. Shock waves were generated by rapid local medium heating due to nonradiative relaxation of high electronically excited states of photosensitizer molecules introduced with a high-power laser pulse. It has been shown that upon exposure to shock waves bacteria display an increase in membrane permeability; erythrosine enters the cells, followed by an increase in the photodynamic efficacy on microorganisms.

Keywords: shock waves, cell membrane permeabilization, antimicrobial photodynamic therapy