

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

Кафедра биохимии и биофизики

**ЗОЛОТЫЕ НАНОДИСКИ КАК ФОТОТЕРМИЧЕСКИЕ АГЕНТЫ
ПРИ АНТИМИКРОБНОМ ФОТОДИНАМИЧЕСКОМ ВОЗДЕЙСТВИИ
НА СТАФИЛОКОККИ**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

студента 4 курса 421 группы
направления 06.03.01 Биология
Биологического факультета
Аллакуатова Артура Тимуровича

Научный руководитель:

доцент кафедры биохимии

и биофизики, к.б.н.

_____ Е.С. Тучина

Зав. кафедрой биохимии и биофизики,

д.б.н., профессор

_____ С.А. Коннова

Саратов 2020

Введение. Достижения, полученные в развитии фотооптической техники, привели к широкому распространению лазерных и светодиодных приборов в научной исследовательской практике. Излучение различного спектра и мощности активно используется в различных областях медицины: онкологии [1,2], стоматологии [3,4], дерматологии, косметологии, при фотодинамической терапии [5,6].

Фотодинамическое воздействие используется для лечения онкологических заболеваний, в качестве антимикробной терапии, все более распространено при проведении различных физиотерапевтических и косметических процедур. Известно, что при таком воздействии погибают и те штаммы бактерий, у которых выработалась устойчивость к антибиотикам [7].

Стремительный прогресс в области нанотехнологий предоставил научному сообществу широкий арсенал новых материалов с уникальными оптическими и физико-химическими свойствами для исследований в биологии и медицине.

Актуальность данной работы заключается в перспективности использования наночастиц в биомедицинской практике. Благодаря своей молекулярной структуре и небольшим размерам, наночастицы различных металлов и их вариации обладают рядом уникальных физико-химических свойств, что делает возможным их использование в микроскопии, биосенсорике, лазерной терапии, диагностике патологических состояний и инфекционных заболеваний, и т.д. Современные технологии позволяют создавать наночастицы заданного размера и формы с характеристиками, адаптированными для каждой конкретной области применения [6-10].

В связи с вышеизложенным цель работы: оценить реакцию грамположительных микроорганизмов *S. aureus* 209 P на комплексное

фототермическое воздействие инфракрасного лазерного излучения и золотых нанодисков, иммобилизованных на стеклянной поверхности.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

1) изучить темновую токсичность золотых нанодисков по отношению к микроорганизмам *S. aureus* 209 P;

2) выявить чувствительность *S. aureus* 209 P к действию лазерного инфракрасного излучения (808 нм, 400 мВт/см²);

3) определить влияние лазерного инфракрасного излучения (808 нм, 400 мВт/см²) в сочетании с золотыми нанодисками на выживаемость клеток *S. aureus* 209 P;

4) оценить изменения температуры бактериальных взвесей, содержащих *S. aureus* 209 P, в ходе комплексного фототермического действия лазерного инфракрасного излучения (808 нм, 400 мВт/см²) и золотых нанодисков.

В качестве исследуемого объекта были выбраны бактерии *S. aureus* 209 P (ГИСК им. Л. А. Тарасевича, Москва, Россия).

Источником инфракрасного излучения служил диодный лазер с максимумом излучения на длине волны $\lambda=808$ нм и плотностью мощности 400 мВт/см².

Также в работе использовали образцы ЗНД с различными характеристиками (таблица 1), иммобилизованные на стеклянных пластинах. Данные пластинки были любезно предоставлены сотрудниками университета Хьюстона (штат Техас, США).

Таблица 1 – Характеристики использованных в работе ЗНД

Аббревиатура	Диаметр, нм	Толщина, нм	Авторы
ЗНД1	400	75	G. M. Santos et al.
ЗНД2	500	75	W-C. Shih et al.
ЗНД3	200	80	J. Qi et al.

Для измерения температуры рабочих суспензий на поверхности пластинок с ЗНЧ использовали цифровой мультиметр (MY68, Mastech, China) с погрешностью измерения $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$, для контрольного измерения использовался тепловизор (IRI 4010, IRISYS, Англия) с погрешностью измерения $\pm 2^{\circ}\text{C}$.

Бакалаврская работа состоит из введения, трех глав (обзор литературы, материалы и методы, результаты исследований и их обсуждение), заключения, выводов, списка использованных источников, включающего сорок семь источников.

Основное содержание работы. На первом этапе исследований проводили оценку темновой токсичности пленок с ЗНД. Для этого бактериальную суспензию помещали на поверхность пленок и инкубировали в течение 2 ч при температуре 37°C в затемненной камере. Затем переносили на поверхность плотной среды и анализировали значения КОЕ через 24 ч.

В ходе эксперимента по оценке темновой токсичности, было установлено, что ЗНД подавляют рост *S. aureus* 209 P.

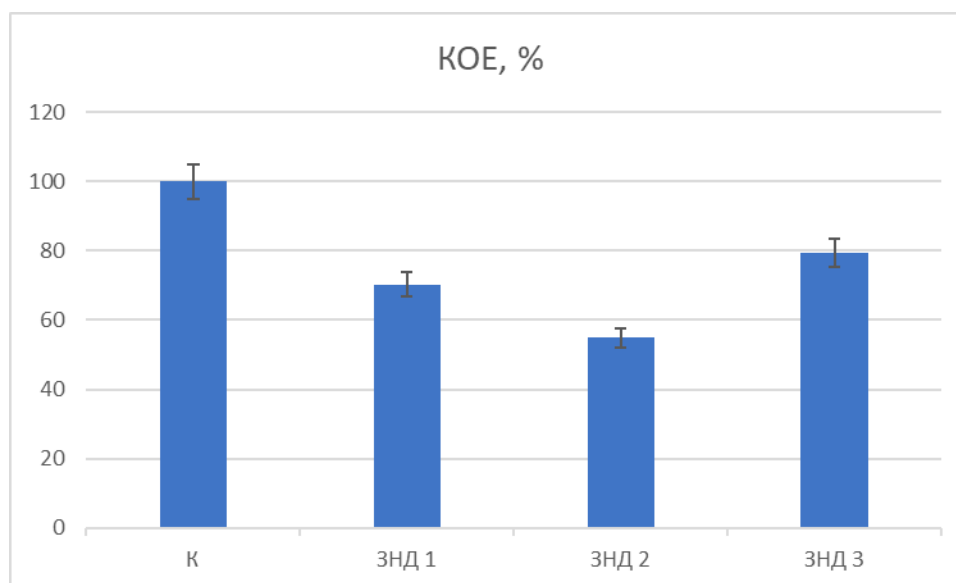


Рисунок 1 – Исследование темновой токсичности ЗНД

При оценке влияния пленок на основе ЗНД (рисунок 1) наблюдалось уменьшение числа КОЕ. В отсутствии облучения ЗНД ингибируют рост

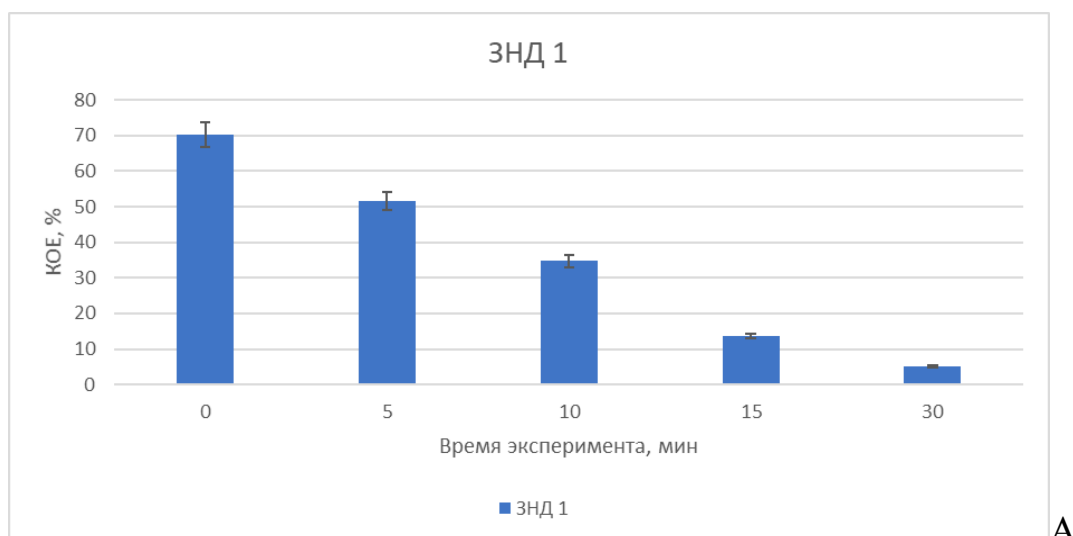
бактериальных популяций, ЗНД1 - до 30%, ЗНД2 – до 45%, ЗНД3 – до 21% от контроля соответственно.

При оценке влияния лазерного инфракрасного (808 нм) излучения и наночастиц на бактерии *S. aureus* было установлено, что инфракрасное лазерное излучение с длиной волны 808 нм (400 мВт/см^2) подавляет рост клеток *S. aureus* (рисунок 2).

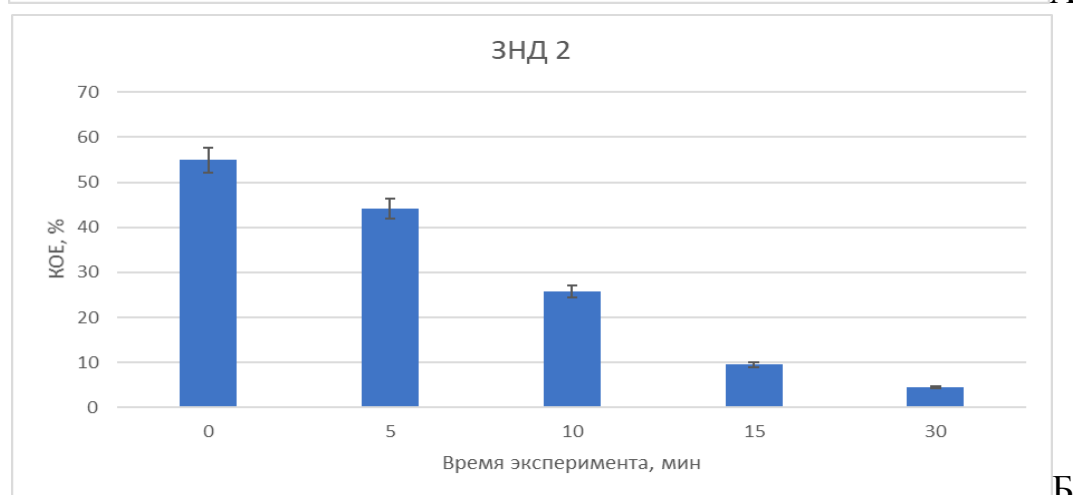
После кратковременного облучения (5 мин) численность КОЕ в контроле снизилась на 34% по сравнению с контролем без облучения. На исследуемых образцах с ЗНД так же отмечено заметное снижение КОЕ к контролю, самое значимое ингибирование численности КОЕ наблюдается в варианте со 2 пластинкой – количество КОЕ уменьшилось на 56% (рисунок 2, Б). На третьей пластике численность КОЕ снизилась на 38% по сравнению с контролем без облучения и на 6%, по сравнению с контролем после пятиминутного облучения (рисунок 2, Б). Связано это с наибольшими значениями диаметра и толщины ЗНД, а, следовательно, наибольшей способностью их к светопоглощению.

При облучении образцов в течение 10 минут численность КОЕ в контроле снизилась до 57%. По сравнению с этим контролем развитие КОЕ на ЗНД3 не изменяется (рисунок 2, В). Самое большое снижение численности КОЕ относительно данного контроля всё так же наблюдается в варианте со второй пластинкой – до 26% от исходного количества.

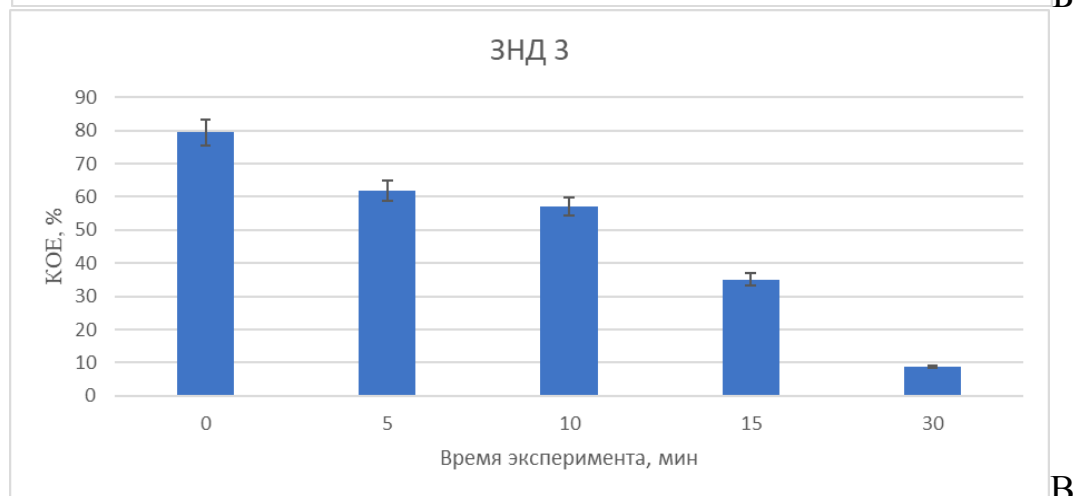
В образцах, полученных в результате облучения через 15 минут, численность КОЕ в контроле снизилась до 45%. Наибольшее снижение численности КОЕ по-прежнему наблюдается на второй пластинке. По сравнению с контролем через 15 минут численность КОЕ снизилась до 10% от контроля без облучения лазером.



А



Б



В

Рисунок 2 – Влияние инфракрасного (808 нм) излучения на бактерии в присутствии золотых нанодисков

Так же близкий по значению результат у первой пластинки, число КОЕ снизилось до 14%. Численность КОЕ на ЗНД3 составила 35%, что на 10% ниже контроля через 15 минут облучения.

После 30-минутного облучения на пластинках 1 и 2 осталось лишь 5% КОЕ от контроля без облучения. Контроль и ЗНД3 имеют примерно равное количество КОЕ - по 9% (рисунок 2).

Таким образом, инфракрасное лазерное излучение с длиной волны 808 нм и плотностью излучения 400 мВт/см^2 подавляет рост клеток *S. aureus* 209 P. Уменьшение числа КОЕ отмечено на 34% после 5 мин, на 43% после 10 мин, на 55% после 15 мин и на 91% после 30 мин облучения по сравнению с контролем.

Нанесение суспензий *S. aureus* на золотые нанодиски несколько подавляет рост бактерий в отсутствие облучения, однако ИК-облучение приводит к существенному снижению их численности уменьшение числа КОЕ.

В варианте с ЗНД1 ингибирование числа КОЕ составляет 30% без облучения, 48% после 5 минут, 65% после 10 минут, 86% после 15 минут и 95% после 30 минут облучения. Уменьшение числа КОЕ в варианте с ЗНД2 было самым резким: на 45 % без облучения, на 56%, 74%, 90% и 95% через 5, 10, 15 и 30 минут облучения соответственно. Наименьшее ингибирование численности КОЕ наблюдается в варианте ЗНД3. Без облучения численность КОЕ снизилась на 21%, после облучения в течении 5, 10, 15 и 30 минут на 38%, 43%, 65% и 91% соответственно.

В ходе исследования температурных изменений суспензий клеток *S. aureus* при комплексном действии лазерного инфракрасного излучения и золотых наночастиц проводилось измерение температуры после каждого облучения. Полученные данные показывают достоверное повышение температуры как при облучении ИК-лазером чистых бактериальных взвесей, так и в присутствии ЗНД. Поскольку существенных различий для 3 используемых в

опытах пластинок не обнаружено, в таблице 2 представлены усредненные сведения.

Таблица 2 – Изменение средней температуры бактериальных взвесей при воздействии инфракрасного лазерного излучения

Время, мин	Т°С			
	Контроль	ЗНД1	ЗНД2	ЗНД3
0	23	23	23	23
5	32	33	36	35
10	34	36	42	36
15	35	39	44	38
30	40	43	46	44
$\Delta T^{\circ}\text{C}$	17	20	23	21
$\Delta T_{\text{p-ра}} - \Delta T_{\text{к}}, ^{\circ}\text{C}$	-	3	6	4

При действии лазерного ИК (808 нм) излучения на контрольную взвесь в течение 30 мин температура изменилась примерно примерно на 2,7°С. При облучении суспензий с участием ЗНД разница в температуре более существенна, на 1 пластинке температура возросла на 20°С, на 2 пластинке - на 23°С и на 3 пластинке – на 21°С. Основное повреждающее действие лазерного ИК излучения и золотых наночастиц связано с локальным нагревом среды вблизи клеточных мембран. Поглощение излучения наночастицами на длинах волн в пределах их плазмонного резонанса приводит к значительному повышению температуры вблизи наночастиц и соответственно повреждению клеточных структур [11-13]. Увеличение температуры бактериальных суспензий происходило дозозависимо; пиковые значения зарегистрированы после 30 мин облучения ИК-лазером. Повышение температуры взвесей без наночастиц, после облучения, было незначительным (см. таблицу 2).

1. Можно предположить, что температура в области соприкосновения наночастиц со стенкой микроорганизмов существенно выше, чем средняя величина нагрева суспензии клеток. В результате локального нагрева сразу несколькими близлежащими наночастицами происходит повреждение клеточной стенки и мембраны бактерии, вследствие чего клетка гибнет. Соответствующие расчеты для локального нагрева представлены в работе [6]. В работах [6,14] показано, что гибель микроорганизмов происходит при нагреве суспензии всего на несколько градусов, что говорит о том, что локальная температура вблизи наночастиц, прикрепленных к стенке клетки, существенно выше, чем средняя, поскольку порог разрушения биологического материала для непрерывного излучения составляет порядка 50-60°C. Однако для микроорганизмов, имеющих достаточно толстую (100 нм) стенку, пороги разрушения оказываются несколько выше [15].

2. Несмотря на то, что увеличение температуры среды по отношению к нагреву ИК излучением не превышало 25°C, локальный нагрев нанодисков вблизи клеточных стенок мог многократно увеличиваться достигать и сотен градусов. Известно, что возможно сохранение жизнеспособности бактерий при нагревании суспензии до 50°C в течение 30 мин, что полностью согласуется с литературными данными о толерантности стафилококков к факторам окружающей среды, в том числе и к температуре до 65-70 °C. Кроме того, повышение температуры на 20-23°C наблюдалось лишь к концу световой экспозиции в 30 мин.

Заключение. Показано, что комплексное фотодинамическое и фототермическое действие лазерного излучения с длиной волны в инфракрасной области спектра в сочетании с золотыми наночастицами обладает антимикробными свойствами, подавляя рост модельного штамма *S. aureus*. Вероятно, данный метод можно рекомендовать для подавления роста других

патогенных микроорганизмов, возбудителей госпитальных инфекций устойчивых к антибиотикам и дезинфицирующим средствам. При дальнейшей оптимизации, либо вариации используемых методов как по величинам концентрации всех компонентов, включая наночастицы, так и плотности мощности лазерного излучения, дозе и, возможно, переходу к импульсному режиму, чтобы обеспечить как локальный нагрев наночастиц, так и окружающих их биологических структур без существенного нагрева бактериальной взвеси.

Представляют интерес дальнейшие исследования по изучению влияния лазерного излучения в совокупности с ЗНЧ. Возможно использование золота уже не в виде пленки, а ЗНЧ различных конфигураций (наносферы, наноклетки и т.д.), а также оснащение их различными функциональными группами. Также будет полезным экспериментальный опыт работы с моделями лабораторных животных. Получение таких сведений позволит установить новые закономерности лазерной дезактивации патогенов, в частности стафилококковой инфекции, в условиях живого организма с учетом влияния иммунного отклика и в реальных условиях освещения и распределения микроорганизмов.

Выводы: 1. Показано, что в отсутствие облучения ЗНД ингибируют рост бактериальных популяций, ЗНД1 - до 30%, ЗНД2 – до 45%, ЗНД3 – до 21% от контроля соответственно.

2. При облучении клеток *S. aureus* 209 P лазером (808 нм, 400 мВт/см²) было выявлено его ингибирующее действие. Так же установлено, что с увеличением времени воздействия инфракрасного излучения степень подавления роста *S. aureus* 209 P увеличивается: снижение КОЕ отмечено на 91 – 95% по сравнению с контролем при времени облучения до 30 мин.

3. При комплексном воздействии лазерного инфракрасного излучения (808 нм, 400 мВт/см²) в сочетании с золотыми нанодисками на клетки *S. aureus* 209 P наблюдается существенное снижение числа КОЕ (до 95-99%). Наибольшую эффективность демонстрировал образец ЗНД2 с диаметром золотых нанодисков 500 нм.

4. Установлено, что при комплексном воздействии лазерного инфракрасного излучения (808 нм, 400 мВт/см²) и золотых нанодисков на клетки *S. aureus* 209 P происходит повышение температуры бактериальных взвесей (на 3-6 °С по сравнению с контролем), что косвенно свидетельствует о возникновении фототермических процессов, обеспечивающих выраженный антибактериальный эффект.

Список использованных источников

1. Механизмы фотодинамического воздействия при лечении онкологических больных / А.Л. Акопов [и др.] // Фотодинамическая терапия и диагностика. – 2015. – № 4. — С. 9–16.
2. Возможности близкофокусной рентгенотерапии в комбинации с фотодинамической терапией при местнораспространенном базальноклеточном раке кожи / М.Д. Тер-Ованесов [и др.] // Материалы второго международного форума онкологии и радиологии, Москва. – 2019. – С. 264–265.
3. Грачева, Е.В. Фотодинамическая терапия. Фотодинамическая терапия. Обзор современных методик лечения заболеваний пародонта. / Е.В. Грачева, Е.А. Гриценко // Бюллетень медицинских Интернет-конференций. — 2013. – Т. 3, № 2. — С. 358–360.
4. Фотодинамическая терапия основных стоматологических заболеваний: методические рекомендации для врачей стоматологических специальностей. / Н.Я. Молоканов [и др.] // Смоленский медицинский альманах, Смоленск. – 2019. – 45 с.

5. Hamblin, M.R. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease / M.R. Hamblin, T. Hasan // Photochemical & Photobiological Sciences. 2004. – V. 3, N. 5. – P. 436–450.
6. Использование меченых антителами золотых наностержней при фототермическом воздействии ИК лазерного излучения на *Staphylococcus aureus* / Е.С. Тучина [и др.] // Квантовая электроника. – 2014. – Т. 44, № 7. – С. 683 – 688.
7. Васильев, Н.Е. Антимикробная фотодинамическая терапия / Н.Е. Васильев, А.П. Огиренко // Лазерная медицина. – 2002. – Т. 6, № 1. – С. 32–38.
8. Лукьянец, Е.А. Поиск новых фотосенсибилизаторов для фотодинамической терапии / Е.А. Лукьянец // Фотодинамическая терапия и фотодиагностика. – 2013. – № 3. – 16 с.
9. Влияние природы полимера-стабилизатора на размерные характеристики наночастиц золота / Е.В. Саломатина, Л.А. Смирнова, А.Е. Мочалова // Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского, 2013. – № 2. – С. 107-112.
10. Наночастицы золота и их применение для тераностики заболеваний человека / Н.С. Марченков, Н.В. Марченко // Медицинская физика – 2014. – № 4. – С. 64-77.
11. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* / Q. L. Feng [et al.] // Journal of biomedical materials research. – 2001. – V. 52. – P. 662 – 668.
12. In vivo photoacoustic molecular imaging with simultaneous multiple selective targeting using antibody–conjugated gold nanorods / P.C. Li [et al.] // Optics Express. – 2008. – V. 16, N. 23. – P. 18605–18615.

13. Optical amplification of photothermal therapy with gold nanoparticles and nanoclusters / B. Khlebtsov [et al.] // *Nanotechnology*. – 2006. – V. 17, N. 20. – P. 5167.
14. Williams, D.N. Evaluation of the microbial growth response to inorganic nanoparticles / D.N. Williams, S.H. Ehrman, T.R.P. Holoman // *Journal of nanobiotechnology*. – 2006. – V. 4, N. 1. – P. 3–8.
15. A pilot study of ICG laser therapy of acne vulgaris: photodynamic and photothermolysis treatment / V.V. Tuchin [et al.] // *Lasers in surgery and medicine*. – 2003. – V. 33, N. 5. – P. 296–310.