

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

Кафедра биохимии и биофизики

**АНТИМИКРОБНОЕ ФОТОТЕРМИЧЕСКОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЗОЛОТЫХ НАНОЧАСТИЦ**

АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 2 курса 241 группы

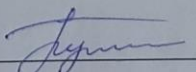
Направление подготовки магистратуры 06.04.01 Биология

Биологического факультета

Лоскутовой Екатерины Алексеевны

Научный руководитель:

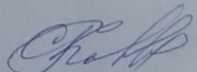
доцент, кан. биол. наук


30.05.2022

Е. С. Тучина

Зав. кафедрой:

профессор, док. биол. наук


30.05.2022

С. А. Коннова

Саратов 2022

Введение. Достижения, полученные за последние несколько десятилетий в области нанотехнологий и фотооптической техники, привели к широкому распространению светодиодных и лазерных приборов с разным спектром воздействия (от 400 до 850 нм). На сегодняшний день, разработанные оптические приборы активно применяются в разных областях медицины: в онкологии [1, 2], в физиотерапии и косметологии [3, 4], в стоматологии [5, 6], при фотодинамической терапии [6].

Важнейшим альтернативным методом лечения инфекционных заболеваний в медицине является метод антимикробной фотодинамической терапии (АФДТ). Поскольку многие патогенные микроорганизмы, вызывающие воспалительные процессы в организме, обладают повышенной резистентностью к антибиотикотерапии, существовала необходимость разработки нового способа борьбы с ними. Доказано, что фотодинамическое воздействие способно вызывать гибель даже тех штаммов бактерий, у которых была выработана устойчивость к антибиотикам [7]. Терапевтический эффект АФДТ заключается в процессе окислительной деструкции патогенных микроорганизмов, вызванной совместным действием лазерного излучения с определённой длиной волны и фототермического красителя [8].

Благодаря прогрессу в области нанотехнологий, научное сообщество имеет значительный материал, обладающий уникальными физико-химическими и оптическими свойствами. В частности, большой интерес вызывает использование наночастиц металлов из-за их уникальной эффективности и специфичности в визуализации, диагностике и терапии.

Актуальность данной работы заключается в перспективности использования наночастиц в клинической биомедицинской практике. Благодаря широкому разнообразию возможных форм, регулируемых физических свойств, включая длину волны поглощения в диапазоне плазмонного резонанса, наночастицы металлов и их вариации представляют большой интерес для исследователей в решении проблем лазерной терапии, при диагностике инфекционных заболеваний, патогенных состояний и т. д. Современные

технологии позволяют создавать наночастицы заданных размеров, форм, обладающие теми свойствами, которые необходимо в конкретной области применения.

Цель работы заключалась в оценке эффективности антимикробного комбинированного действия инфракрасного лазерного излучения и золотых наночастиц в различных модификациях на *Staphylococcus aureus* 209 P и *Escherichia coli* 113-13.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

1. Изучить влияние инфракрасного лазерного излучения (808 нм, 60 мВт/см²) на жизнеспособность двух видов микроорганизмов: *S. aureus* 209 P и *E. coli* 113-13.

2. Выявить чувствительность бактериальных культур *S. aureus* 209 P и *E. coli* 113-13 к комплексному действию инфракрасного лазерного излучения (808 нм, 60 мВт/см²) и золотых наночастиц (нанозвезд, нанокейджей, наносфер).

3. Оценить изменения температуры бактериальных взвесей в ходе комплексного фототермического действия инфракрасного лазерного излучения (808 нм, 60 мВт/см²) и золотых наночастиц.

В качестве объектов исследования использовали музейные штаммы следующих видов бактерий – *Staphylococcus aureus* 209 P и *Escherichia coli* 113-13 (ГИСК им. Л.А. Трасевича, г. Москва).

Источником инфракрасного излучения служил лазер с максимумом спектра испускания $\lambda=808$ нм и плотностью мощности 60 мВт/см². Время облучения варьировалось от 5 до 30 минут.

В работе использовался раствор полиэтиленгликоля (ПЭГ). Данное соединение применялось для обработки золотых наночастиц, чтобы предотвратить их склеивание друг с другом и продления их функционального значения. В рамках исследования представляло интерес изучить может ли сам ПЭГ оказывать токсичное влияние на бактериальные клетки при лазерном облучении. Также в работе использовались образцы золотых наночастиц,

представленных золотыми нанозвёздами, нанокейджами и наносферами, которые были предоставлены нам сотрудникам лаборатории нанобиотехнологии ИБФРМ РАН, синтезированные, как описано ранее [9].

Облучение бактериальных взвесей проводили на иммунологических полистирольных планшетах. Внесение бактериальной суспензии в лунки планшета осуществлялся дозатором с помощью стерильных наконечников объёмами от 200 до 1000 мкл.

Для измерения температуры бактериальных суспензий на иммунологических тест-планшетах с золотыми наночастицами (ЗНЧ) использовали цифровой мультиметр (MY68, Mastech, China) с погрешностью измерения $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$, путём погружения датчика в суспензию. Для регистрации контрольного измерения температуры использовался цифровой тепловизор (IRI 4010, IRISYS, Англия) с погрешностью измерения $\pm 2^{\circ}\text{C}$.

Магистерская работа состоит из введения, трёх глав (обзор литературы, материалы и методы, результаты исследования и их обсуждение), заключения, выводов, списка используемых источников, включающего сто пять источников.

Основное содержание работы. На первом этапе нашего исследования проводилась оценка воздействия инфракрасного низкоинтенсивного лазерного излучения (НИЛИ) (808 нм, 60 мВт/см^2) на жизнеспособность вида бактерий *S. aureus* 209 P и *E. coli* 113-13, отдельно и комплексно с применением ПЭГ. Дозы излучения варьировались в зависимости от изменения экспозиции облучения (5, 10, 15 и 30 минут соответственно).

Анализ полученных результатов показал, что штамм грамположительной бактерии *S. aureus* подвержен слабому действию инфракрасного низкоинтенсивного лазерного излучения (ИК НИЛИ) (рисунок 1). Данные об относительном изменении численности исследуемого стафилококка после промежутка времени от 5 до 30 минут продемонстрировали снижение численности колониеобразующих единиц (КОЕ) лишь на 31% относительно контроля.

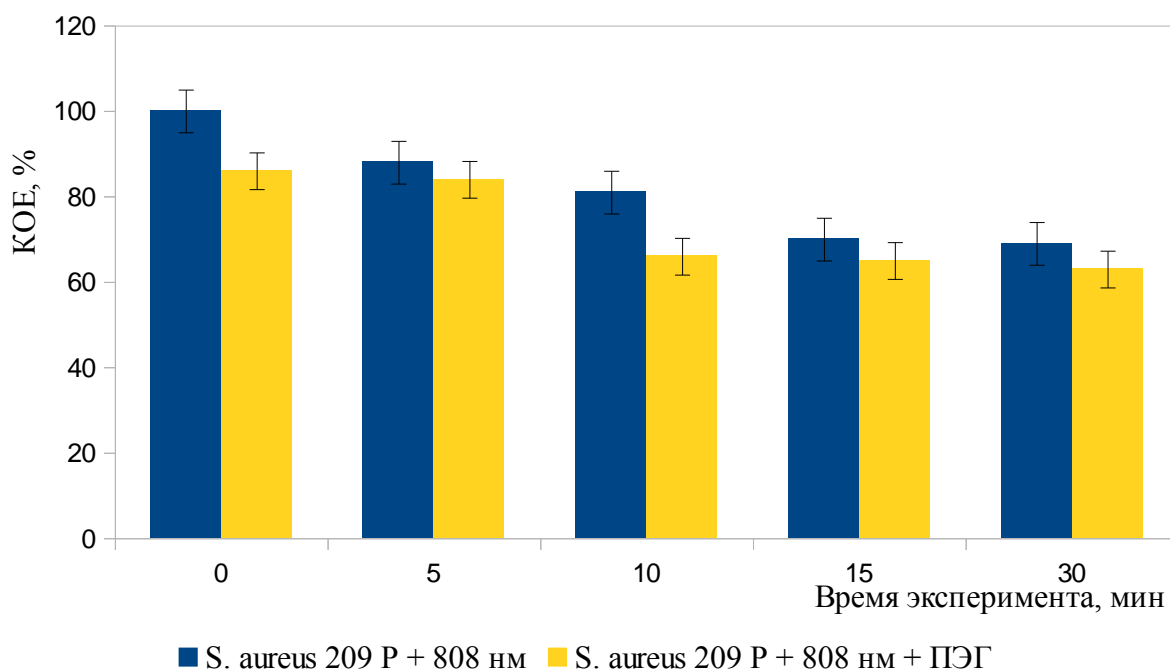


Рисунок 1 – Влияние ИК НИЛИ (808 нм) и ПЭГ на жизнеспособность *S. aureus* 209 P

Воздействие 5, 10 и 15 минут инфракрасного лазера (808 нм) приводило к стабильному уменьшению показателей на 12%, 19% и 30% относительно контроля.

Комплексное применение инфракрасного источника излучения и ПЭГ также не оказали высокого ингибирующего воздействия на *S. aureus*. На предварительном этапе облучения в течении 5 минут наблюдались сравнительно небольшие изменения в угнетении жизнеспособности микроорганизмов, число КОЕ уменьшилось всего лишь на 3% относительно контроля. Следующий период действия излучения и ПЭГ повышал чувствительность *S. aureus*, КОЕ сократился на 24% соответственно. Однако после 10 минут, увеличение доз воздействия не влияло на жизнеспособность стафилококка. Число КОЕ после 30 минут достоверно сократилась на 27% относительно контроля.

Значительный угнетающий эффект ИК НИЛИ и ПЭГ оказали на грамотрицательную бактерию *E. coli*. Экспериментально установлено, что

получая дозу облучения в первые 5 минут, численность КОЕ уменьшилась на 26% по сравнению с контролем (рисунок 2). После 10 минут облучения выявлено снижение числа КОЕ на 32% относительно контроля, после 15 минут — на 37%, а после 30 минут число КОЕ достигало 50%.

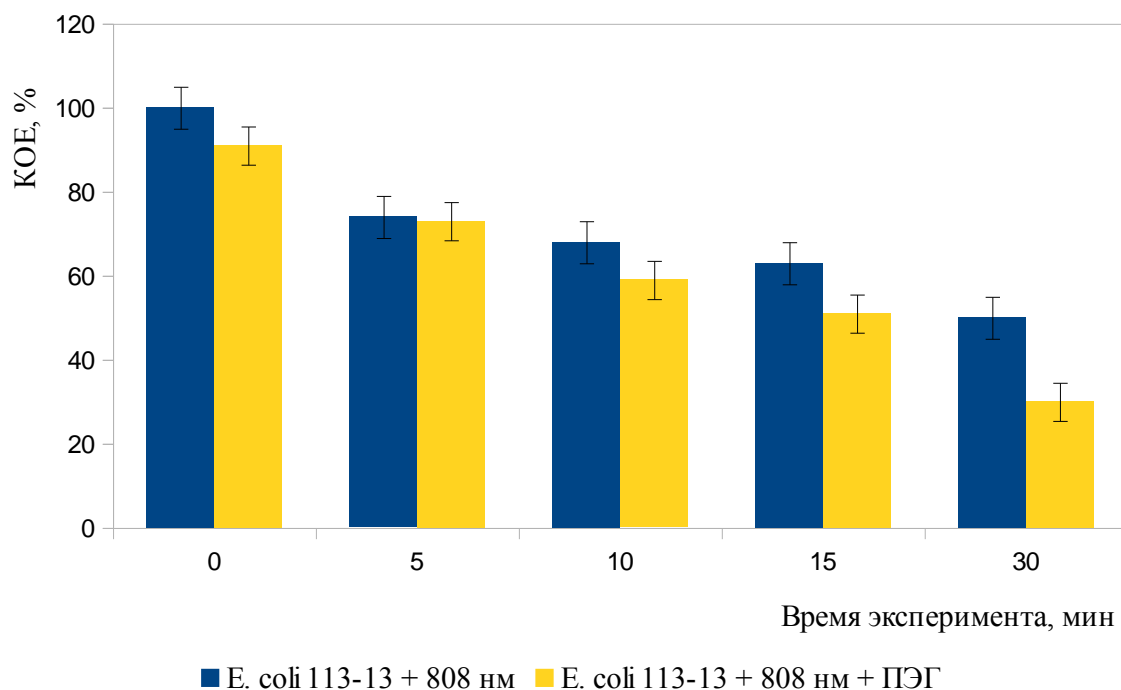


Рисунок 2 – Влияние ИК НИЛИ (808 нм) и ПЭГ на жизнеспособность *E. coli 113-13*

В ходе эксперимента наблюдался линейный характер снижения жизнеспособности микроорганизмов при совместном действии ИК НИЛИ и ПЭГ. Самые значимые ингибирующие действия были отмечены в первые (5 минут) и последние (30 минут) периоды фототермической терапии: численность КОЕ уменьшилась на 20 и 67%. После облучения образцов в течении 10 и 15 минут численность КОЕ в контроле снижалась на 35 и 44%.

Таким образом, полиэтиленгликоля может оказывать токсическое действие при фототермическом воздействии на патогенные бактериальные клетки. Наибольшую чувствительность проявили грамотрицательные бактерии *E. coli 113-13*. После предварительной обработки бактериальных клеток раствором ПЭГ наблюдалась значительная скорость угнетения

жизнеспособности колоний на протяжении всего процесса фотовоздействия. Большой устойчивостью обладал вид грамположительной бактерии *S. aureus* 209 P. Присутствие полиэтиленгликоля в растворе с бактериальными клетками не приводил к значительным изменениям в жизнеспособности кокков. После 10 минут воздействия сокращение показателей КОЕ практически не изменялось.

При оценке эффективности фототермического воздействия на исследуемые микроорганизмы при использовании ИК НИЛИ и золотых наночастиц: нанозвёзд (ЗНЗ), нанокейджей (ЗНК) и наносфер (ЗНС), было установлено подавление роста клеток *S. aureus* и *E. coli*.

Временный интервал воздействия от 5 до 30 минут демонстрировал как снижение, так и увеличение численности колоний *S. aureus* при использовании ЗНЗ. Максимальное подавляющее действие оказывало облучение в течении 5 минут (уменьшение показателя КОЕ составило 25% от исходного количества) (рисунок 3). В течении 10 минут КОЕ снизилась ещё на 43% относительно контроля. Однако дальнейшее 15-минутное воздействие лазера и ЗНЗ приводило к резкому увеличению численности бактериальных колоний *S. aureus* на 14% по сравнению с предыдущим временным интервалом и на 32% относительно контрольного показателя. На последнем этапе рост бактериальных клеток снова сокращался до 51% от контроля.

На грамотрицательные бактерии *E. coli* ИК НИЛИ и ЗНЗ оказали высокое ингибирующее воздействие, которое привело практически к полному сокращению численности колоний (КОЕ снизилось на 88% после 30 минут облучения). Самые значительные результаты были отмечены в период 5 минут — число КОЕ снизилось на 47%. В течении 10 и 15 минут КОЕ сократилось на 55 и 62% относительно контроля.

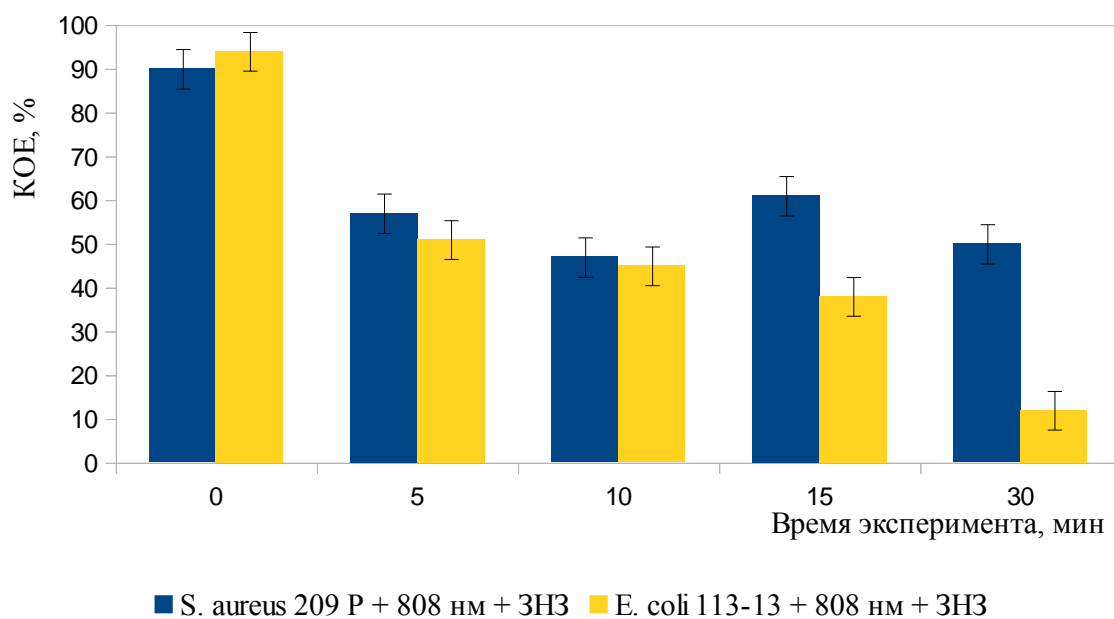


Рисунок 3 — Изменения численности микроорганизмов *S. aureus* 209 P и *E. coli* 113-13 при комбинированном фототермическом действии ИК НИЛИ с длиной волны 808 нм и золотых нанозвёзд.

Таким образом, полученные данные о подавляющем действии ИК НИЛИ с применением золотых нанозвёзд носило двойственный характер на рост грамположительных бактерий *S. aureus* 209 P - от интенсивного подавления роста колоний, до небольшой стимуляции. Тем не менее, в присутствии золотых нанозвёзд чувствительность бактерий *S. aureus* 209 P на лазерное излучение было значительно выше, чем при обычном облучении. Это выражалось в скорости подавлении роста колоний в первые 5 минут фотовоздействия и в конечных результатах КОЕ. Полученные данные отражают высокую эффективность фототермического воздействия на грамотрицательный штамм микроорганизмов *E. coli* 113-13. Воздействие инфракрасного НИЛИ (808 нм, мощность 60 мВт/см²) и ЗНЗ демонстрировал стабильное снижение численности бактериальной культуры.

Установлено, что инфракрасное лазерное излучение с длиной волны (808 нм) совместно с золотыми нанокейджами подавляют рост бактерий *S. aureus* и *E. coli* (рисунок 4).

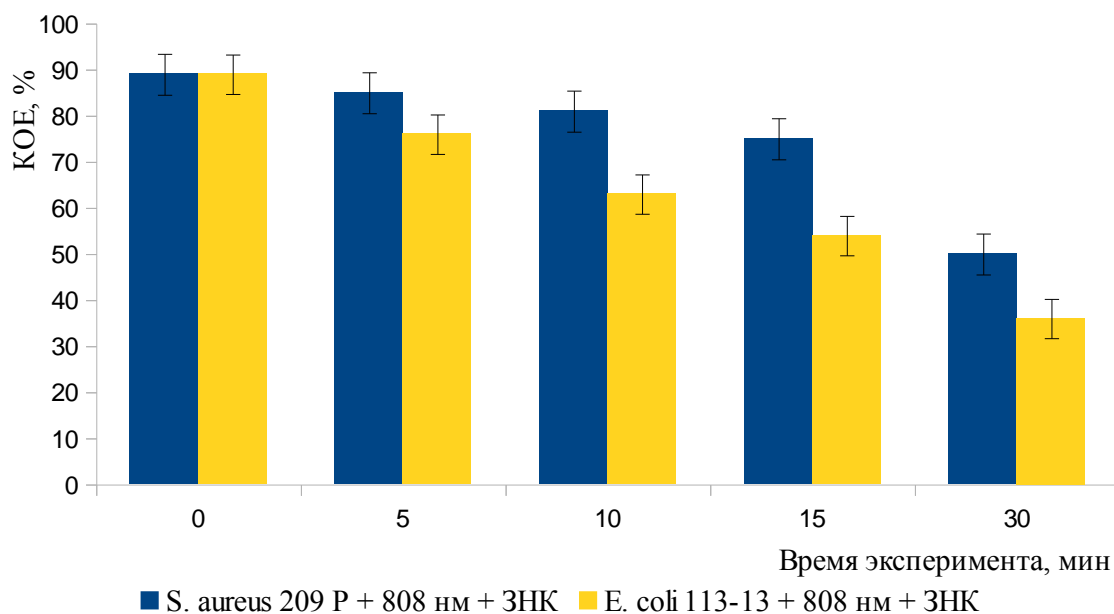


Рисунок 4 – Влияние ИК НИЛИ на бактериальные клетки в присутствии золотых нанокейджей

Для *S. aureus* максимально низкие показатели КОЕ были получены в течении 5 и 10-минутного облучения и составили 5% и 9% относительно контроля. После 15 минут фотовоздействия показатели жизнеспособности снизились на 16%. Самое значимое ингибирование численности КОЕ для *S. aureus* наблюдалось на последнем этапе 30-минутного влияния (значение КОЕ составило 44% относительно контроля). Угнетающее действие ИК НИЛИ и ЗНК на *E. coli* носило линейный характер. Изменение доз облучения от 5 до 30 минут приводило к сокращению КОЕ более чем на 55%. Самые значимые результаты были получены после 10 и 30 минут, показатели КОЕ в эти периоды составили 30% и 60% относительно контроля. В течении 5 и 15 минут облучения численность КОЕ уменьшилась на 15% и 40% соответственно.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о подавляющем действии инфракрасного лазера 808 нм и плотностью мощности 60 мВт/см² и

золотых нанокейдж на жизнеспособность палочковидных и кокковых форм микроорганизмов.

Было установлено, что инфракрасное излучение с применением золотых наносфер оказывало эффективное воздействие на подавление исследуемых бактериальных культур. Наблюдалось снижение числа КОЕ бактерий вида *S. aureus* 209 P на 34% по отношению к контролю уже после первого 5 минутного периода воздействия. Действие источника излучения и ЗНС после 10 минут приводило к чуть менее выраженному эффекту — уменьшение показателя КОЕ по сравнению с предыдущим периодом сократилось лишь на 10%; относительно контрольного показателя КОЕ составило 44%. В образцах, полученных в результате облучения через 15 минут, численность КОЕ в контроле снизилась до 57%. Конечный результат, полученный после 30-минутного периода лазерного воздействия и сенсбилизатора сократило число КОЕ до 63% относительно контроля (рисунок 5).

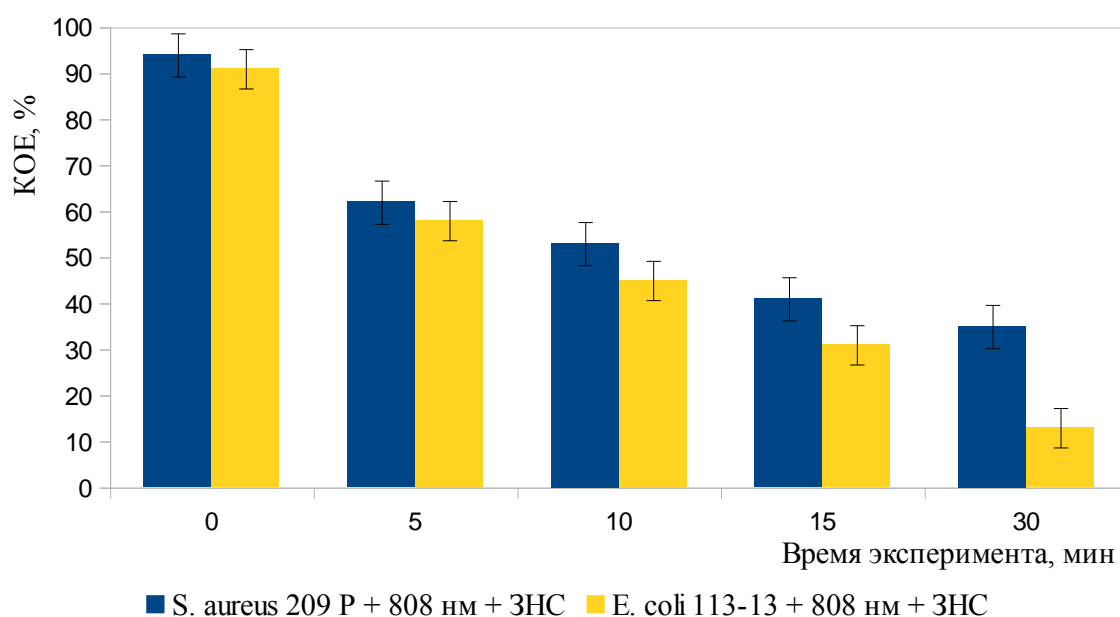


Рисунок 5 — Влияние инфракрасного (808 нм) НИЛИ на бактериальные клетки в присутствии золотых наносфер

У грамотрицательных бактерий *E. coli* наблюдалась схожая со стафилококком тенденция к уменьшению показателей КОЕ после

кратковременного период в 5 минут — численность колоний сократилась на 37% от контрольного показателя. В дальнейшем эффект от фотовоздействия на *E. coli* 113-13 значительно возрастал, их выживаемость снижалась на 83-86% после 30 минут.

Таким образом, метод АФДТ с применением ИК НИЛИ (808 нм 60 мВт/см²) и ЗНС продемонстрировал высокую эффективность воздействия на чувствительность антибиотикорезистентных штаммов бактерий *S. aureus* 209 P и *E. coli* 113-13. Оба вида бактерий проявляли схожую тенденцию по снижению колонеобразования на протяжении всех этапов фотовоздействия. При этом была отмечена более выраженная скорость сокращения численности у палочковидных форм бактерий при использовании всех доз облучения. Кокковые формы, напротив, проявляли большую устойчивость по отношению к данному типу фототерапии. Тем не менее, их жизнеспособность также значительно уменьшалась.

В ходе экспериментов было установлено, что при увеличении времени ИК НИЛИ облучения от 5 до 30 минут растворов, содержащих микроорганизмы, происходит повышение их температуры. Изменения температурного показателя были характерны для обоих вариантов бактериальных суспензий *S. aureus* и *E. coli* как в случае облучения чистой культуры, так и содержащей ЗНЧ.

Проведённые термометрические исследования бактериальных суспензий показали, что повышение температуры контрольных образцов, не содержащих фототермических агентов, в обоих случаях в среднем составило 3,6 °С на протяжении всего времени эксперимента. Также не было замечено существенных различий температурных изменений у бактерий *S. aureus* и *E. coli*, обработанные разными видами золотых наночастиц. Поэтому в предоставленной таблице 1 указаны усреднённые данные об изменениях температуры при фотовоздействии на оба вида исследуемых микроорганизмов.

Согласно полученным результатам эксперимента, отражённым в таблице 1, при облучении растворов бактериальных суспензий *S. aureus* и *E. coli*,

обработанных ЗНЗ, ЗНК и ЗНС, итоговая разница температурных показателей не превышала 1 °С. Увеличение температур происходило дозозависимо на протяжении всех экспериментальных этапах.

Таблица 1 – Изменение средней температуры бактериальных взвесей при воздействии инфракрасного лазерного излучения (808 нм, 60 мВт/см²)

Время, мин	Т°С			
	Контроль	ЗНЗ	ЗНК	ЗНС
0	25	25	25	25
5	31	33	35	36
10	33	36	36	42
15	36	39	38	44
30	43	45	44	47
ΔТ°С	18	20	21	22
ΔТ _{р-ра} - Т _к °С	-	2	4	4

Примечание: контроль – бактериальные суспензии, не содержавшие наночастиц, ЗНЗ – бактериальные суспензии, содержавшие золотые нанозвезды, ЗНС - бактериальные суспензии, содержавшие золотые наносферы, ЗНК – бактериальные суспензии, содержавшие золотые нанокейджи.

При этом отмечались периоды, когда скорость повышения температуры возрастала и периоды, когда она была более умеренной. Так, при облучении растворов бактериальных суспензий с ЗНЗ или ЗНК, наблюдалась значительное изменение температур уже в первые 5 минут фотовоздействия на 8 °С и 10 °С от зафиксированных контрольных показателей. Дальнейшее увеличение температур было незначительным как для ЗНЗ, так и для ЗНК и не превышали 3-4 °С. Пиковые значения регистрировались после 30-минутного воздействия ИК НИЛИ и составили 20 °С для суспензий с золотыми нанозвёздами и 21 °С для суспензий с золотыми нанокейджами. Наиболее существенные показатели увеличения температур были характерны для растворов бактериальных взвесей с ЗНС. Пиковое значение после 30 минут облучения инфракрасным НИЛИ (808 нм, 60 мВт/см²) повысилось на 22 °С от контроля.

Гибель микроорганизмов в суспензиях может происходить при незначительных изменениях температуры (на 1-5 °С). Это говорит нам о том, что локальная температура наночастиц, прикрепленных к бактериальной клеточной стенке, выше средней, поскольку порог, разрушающий биологический материал при непрерывном облучении составляет 50-60 °С. Кроме того, для бактерий, имеющих толстую клеточную стенку (100 нм), губительный порог может достигать более высоких температурных показателей.

Несмотря на то, что увеличение температуры среды не превышала 20-23 °С на протяжении всего периода воздействия ИК НИЛИ, локальный нагрев между ЗНЧ и клеточной мембраной *S. aureus* и *E. coli* мог увеличиваться и достигать сотни градусов. Известно, что некоторые бактерии способны сохранять свою жизнеспособность при изменении факторов окружающей среды, в том числе и повышении температуры. Это утверждение согласуется с литературными данными о способности стафилококков выдерживать 30-минутное нагревание до 80 °С [10].

Основное повреждающее действие ИК излучение, с применением наночастиц золота вызывает локальный нагрев среды вблизи клеточных мембран бактерий. Известно, что контакт ЗНЗ с липидами биологических мембран приводит к локальному нагреву в результате поверхностного плазмонного резонанса (ППР). Фототермическое преобразование с использованием ППР использует разницу в скоростях термической релаксации между липидами и окружающими молекулами воды, что приводит к мгновенному «кипению» липидных компонентов и разрушению мембран. Оценки разности локальной температуры в окрестности наночастицы и средней температуры суспензии представлены в [11]. Этот механизм лежит в основе повреждений, возникающих в клетке и приводящих к ее гибели.

Заключение. Изучено комплексное фотодинамическое и фототермическое действие низкоинтенсивного лазерного излучения с длиной волны в инфракрасном оптическом спектре с разными золотыми

наноструктурами: нанозвёзды, нанокейджи и наносферы. Также в рамках нашего исследования было использовано соединение — полиэтиленгликоль (ПЭГ), в качестве возможного фототермического агента. Было показано, что совместное действие источника света и ФС вызывало эффективный антимикробный ответ, подавляющий рост модельных штаммов грамположительных *S. aureus* 209 P и грамотрицательных *E. coli* 113-13. Вероятно, что данный метод можно рекомендовать для дальнейших исследований подавления роста патогенных микроорганизмов, резистентных к антибиотикам. Дальнейшая оптимизация используемых методов может включать в себя изменения концентраций всех используемых компонентов, увеличение плотности мощности лазерного воздействия, вариации доз излучения, возможно, переход к импульсному режиму, чтобы обеспечить нагрев наночастиц не только вблизи непосредственно клеточных мембран, но и в окружающих их биологических структурах без существенного нагрева бактериальной взвеси.

Представляет интерес дальнейшее изучение влияния лазерного излучения в совокупности с золотыми наночастицами. Возможно использование разных модификаций ЗНЧ, в их различных концентрациях, а также оснащённых различными функциональными группами.

Выводы: 1. Установлено сокращение численности *S. aureus* 209 P на 31 % и *E. coli* 113-13 на 50 % под действием лазерного инфракрасного (808 нм, 60 мВт/см²) излучения.

2. Показано, что использование в качестве фототермических агентов золотых нанозвезд и нанокейджей приводит к сокращению численности *S. aureus* 209 P на 50% после 30 мин воздействия ИК НИЛИ, а использование золотых наносфер снижает показатель выживаемости данного микроорганизма на 75%.

3. По результатам экспериментов выявлена высокая чувствительность *E. coli* 113-13 к комплексному фототермическому действию ИК НИЛИ и золотых наночастиц: использование золотых нанокейджей приводило к сокращению

числа КОЕ на 74%, использование золотых нанозвезд и наносфер - на 87% по сравнению с контролем.

4. Динамика изменения температурного показателя для двух исследованных культур носила сходный характер. Показано повышение температуры облученных взвесей на 2-4 °С к 30 мин комбинированного действия ИК НИЛИ (808 нм, 60 мВт/см²) и золотых наночастиц.

Список используемых источников.

- 1 Механизмы фотодинамического воздействия при лечении онкологических больных / А.Л. Акопов [и др.] // Фотодинамическая терапия и диагностика. – 2015. – Т. 4, № 2. – С. 9–16.
- 2 Дуванский, В. А. Современные аспекты фотодинамической терапии заболеваний пищевода / В. А. Дуванский, М. В. Князев, П. В. Праведников // Экспериментальная клиническая гастроэнтерология. – 2011. – № 10. – С. 111-116.
- 3 Photodynamic therapy / T. J. Dougherty [et al.] // J. natl. cancer ins. – 1998. – V. 90, N. 12. – P. 889–905.
- 4 Nanotechnology in dermatology / J. R. Antonio [et. al] // An. Bras. Dermatol. – 2014. – V. 89, N. 1. – P. 126–136.
- 5 Фотодинамическая терапия в стоматологии (обзор литературы) / О. Л. Мишутина [и др.] // Смоленский медицинский альманах. – 2019. – № 3. – С. 102-111.
- 6 Грудянов, А. И. Методы консервативного лечения воспалительных заболеваний пародонта / А. И. Грудянов, Е. В. Фоменко. М.: Изд-во «Мед. инф. агенство», 2013. – 96 с.
- 7 Васильев, Н.Е. Антимикробная фотодинамическая терапия / Н.Е. Васильев, А.П. Огиренко // Лазерная медицина. – 2002. – Т. 6, № 1. – С. 32-38.
- 8 Шахно, Е. А. Физические основы применения лазера в медицине: уч. пос. для вуз / Е. А. Шахно. – СПб: НИУ ИТМО, 2012. – 129 с.
- 9 A novel concept of two-component dielectric function for gold nanostars: theoretical modelling and experimental verification / N.G. Khlebtsov [et al.] //

Nanoscale. – 2020. – V. 12. – P. 19963-19981.

10 Волина, Е.Г. Основы частной микробиологии: учеб. пос. / Е. Г. Волина, Л. Е. Саруханова. – М.: РУДН, 2011. – 189 с.

11 Modeling of hyperthermia induced by functionalized gold nanorods bound to

Staphylococcus aureus under NIR laser radiation / A. N. Yakunin [et. al.] // Proc. SPIE.
– 2019. – V. 4, N. 1. – P. 12.

Yakunin