

Министерство образования и науки Российской Федерации
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

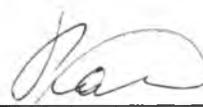
Кафедра биохимии и биофизики

**ВЛИЯНИЕ НОВЫХ ТИПОВ НАНОЧАСТИЦ И СИНЕГО (405НМ)
СВЕТОДИОДНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА СТАФИЛОКОККИ**

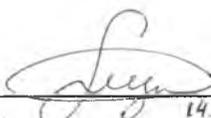
АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студента 4 курса 422 группы
Направления 06.03.01 – Биология
Биологического факультета
Соловьева Вадима Юрьевича

Научный руководитель
Ассистент кафедры биохимии и
биофизики, к.б.н


_____ М.В. Каневский
подпись, дата 14.06.2017

Научный консультант
Доцент кафедры биохимии и биофизики,
к.б.н., доцент


_____ Е.С. Тучина
подпись, дата 14.06.17

Заведующий кафедрой
д.б.н., профессор


_____ С.А. Коннова
подпись, дата 14.06.2017

Саратов 2017

Актуальность работы. В последнее десятилетие медицина столкнулась с проблемой высокой резистентности патогенных микроорганизмов к большинству видов антибиотиков. Поэтому классические методы борьбы становятся непродуктивными, а иногда и вредоносными, когда антибиотики нарушают нормальную микрофлору организма. Альтернативой может являться фотодинамическая терапия.

Staphylococcus aureus является грамположительной бактерией из рода стафилококков. Обнаружен в 1880 году в городе Абердине Александром Огстоном в гное из хирургических абсцессов. Впервые описан в 1884 году Оттомаром Розенбахом. *S. aureus* может вызывать широкий диапазон заболеваний, начиная от лёгких кожных инфекций: угри, фурункулез, флегмона, карбункул, абсцесс до смертельно опасных заболеваний: пневмония, менингит, остеомиелит, эндокардии и сепсис. Диапазон заболеваний простирается от кожных, респираторных, костных, суставных и эндоваскулярных до раневых инфекций. Он до сих пор является одной из четырёх наиболее частых причин внутрибольничных инфекций, часто вызывая послеоперационные раневые инфекции. С момента открытия пенициллина и активного его использования против стафилококка, под давлением естественного отбора в популяции закрепилась мутация, в связи с которой в настоящее время большинство штаммов устойчивы к этому антибиотику, благодаря наличию у золотистого стафилококка пенициллиназы — фермента, расщепляющего молекулу пенициллина. Для борьбы с бактерией широко применяют метициллин — химически модифицированный пенициллин, который пенициллиназа не разрушает. Но сейчас встречаются штаммы, устойчивые и к метициллину, в связи с чем штаммы золотистого стафилококка делят на метициллин-чувствительные (MSSA) и метициллин-устойчивые штаммы золотистого стафилококка (MRSA).

Фотодинамическая терапия (ФДТ) является новым методом в борьбе с патогенными бактериями. Фотодинамический эффект основывается на

активации кислорода квантом света при участии фотосенсибилизатора. Поэтому важным является выбор наиболее эффективных компонентов для данного метода. В литературе присутствуют данные о широком круге фотосенсибилизаторов, применяемых в настоящее время. Актуальными в настоящее время остаются исследования применения наночастиц.

Целью данной работы явилась оценка действия комплексного действия синего света (405 нм) и диоксида титана в различных его модификациях, астраленов, а также их комплексов с ПП IX на выживаемость микроорганизмов.

Для достижения поставленной цели были сформулированы и решались следующие задачи:

1. Проанализировать чувствительность клеток микроорганизмов к воздействию синего света (405 нм) и наночастиц диоксида титана.
2. Оценить эффективность комплексного воздействия синего света (405 нм) и наночастиц астраленов, а также их комплексов с ПП IX.

Структура бакалаврской работы. Выпускная квалификационная работа состоит из пяти частей: введения, основной части, заключения, выводов и списка использованных источников. Основная часть включает в себя три раздела: обзор литературы, материалы и методы и результаты исследования. Раздел обзор литературы состоит из восьми подразделов: метод фотодинамической терапии, фотосенсибилизаторы, наночастицы диоксида титана, использование наночастиц диоксида титана при фотодинамическом воздействии, фуллерены, физико-химические свойства фуллеренов, разнообразие фуллеренов, астралены. Раздел материалы и методы не включает в себя подразделы. Раздел результаты исследования включает в себя пять подразделов: влияние светодиодного синего (405 нм) излучения и наночастиц на выживаемость стафилококков, влияние светодиодного синего (405 нм) излучения и гипсовых композитов на основе диоксида титана на выживаемость микроорганизмов, влияние светодиодного синего (405 нм) излучения и водного раствора астралена на выживаемость *S.aureus*, влияние

протопорфирина IX, а также комплекса астраленов и протопорфирина IX на выживаемость *S. aureus*, обсуждение результатов исследования.

Объектом исследования являлись микроорганизмы метициллин-устойчивого *S. aureus* 209 P (MSSA) и метициллин-устойчивого штаммов *S. aureus* (MRSA). Бактерии выращивали при температуре 37 °С на универсальной плотной питательной среде (ГРМ-агар, Россия, Оболенск).

В качестве **источника излучения** использовали светодиод с максимумом спектра испускания $\lambda=405$ нм и плотностью мощности 70 мВт/см².

В качестве **фотокатализатора** применялись гипсовыенановолокна диоксида титана. Нановолокна были получены путем смешивания обожженного гипса и дистиллированной воды (GY:T2C). В работе наряду с нановолкнами гипса были использованы нановолокна с добавлением азота (GY:T2CN), палладия (GY:T2CPd10R) и комплекса из палладия и азота (GY:T2CNPd20R). Также применялся водный раствор протопорфирина IX в концентрациях 0,12 мг/мл и 0,049 мг/мл. Аналогично в экспериментах был применен водный раствор астраленов (ЗАО «ИЛИП») в концентрации 0,6 мг/мл. Были изготовлены и применены комплексы из астраленов и протопорфирина IX. Комплекс 1 – астрелены (в концентрации 0,6 мг/мл), смешанные с протопорфирином IX (0,049 мг/мл). В состав комплекса 2 входила смесь астраленов (0,6 мг/мл) и протопорфирина IX (0,12 мг/мл).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Экспериментальные исследования проводили на базе кафедры биохимии и биофизики Саратовского государственного университета им. Н. Г. Чернышевского в период с 2015 по 2017 год.

Постановка эксперимента. Для проведения экспериментов использовали следующую схему. Для создания асептических условий использовали иммунологический полистирольный 96-луночный планшет. Источник света располагали над ячейками планшета. При постановке опытов использовали суточную культуру исследуемого штамма. Бактериальную взвесь готовили в стерильном физиологическом растворе; конечная концентрация составляла 5 тыс. микробных клеток на 1 мл. Из разведения микроорганизмов 10^4 мк/мл (стандарт мутности №10) 0,1 мл взвеси вносили в 0,9 мл раствора наночастиц. Из конечного разведения бактериальную взвесь в объеме 0,1 мл вносили в ячейки планшета. Воздействие проводили на бактериальные клетки во взвеси, находящейся в соответствующих ячейках последовательно увеличивая дозу излучения. Время облучения составляло 5, 10, 15 и 30 минут. После воздействия взвеси бактерий переносили на чашки Петри с плотной питательной средой. Учет результатов проводили путем подсчета числа КОЕ через 24 часа. Контролем служили взвеси бактерий не обработанные диоксидом титана и не подвергнутые облучению. Каждый эксперимент проводили в десятикратной повторности. Для статистической обработки экспериментальных данных использовали t-критерий Стьюдента, достоверными считали различия при вероятности ошибки $p < 0,05$.

Для статистической обработки экспериментальных данных использовали программу Microsoft Excel 2010.

Обсуждение результатов исследования. Как показали результаты экспериментов, использование синего (405 нм) излучения оказывает угнетающее действие на *S.aureus*, благодаря эндогенным порфиринам. Воздействие световым излучением вызывает гибель клетки микроорганизма, причем длина волны излучения должна соответствовать спектру поглощения

фотосенсебилизатора. Использование синего света при фотодинамической терапии *in vivo* у ряда авторов показывало значительное улучшение.

Добавление же наночастиц улучшало этот результат. Модификация диоксида титана гипсовыми нанопленками показала значительный результат, наилучшим из которых обладал комплекс пленок с добавлением палладия (уменьшение числа КОЕ до 7% на 30мин). Это можно объяснить тем, что наибольшей способностью к остановке роста микроорганизмов среди модификаций, помимо диоксида титана, обладает палладий. Добавление азота же к палладию приводит к уменьшению фотонов, контактирующих с палладием, и, соответственно, незначительно снижает результат.

Что касается астраленов, то они показали себя как новый вид фотосенсебилизатора из-за низкой стоимости и отсутствия токсичности. Так после 30 минут воздействия число КОЕ уменьшалось до 33.3% у MSSA и до 39,7% у MRSA. Протопорфирин IX выступал здесь в качестве сравнения классического фотосенсебилизатора и астраленов. Собственно, ПП IX показал аналогичные результаты для MSSA (в среднем до 31% на 30 минутах). Но для MRSA ПП IX в обеих концентрациях дал лучший, но не значительно результат (30,3% на 30 минутах в среднем). Концентрация 0.12 мг/мл показывала большее уменьшение КОЕ, ввиду того, что большее количество ППХ дает большее количество активных форм кислорода, пагубно влияющих на микроорганизмы

Создание комплекса астраленов и ППХ дало положительный результат в использовании для борьбы с золотистым стафилококком.

Комплекс 1 (астралены 0.6 мг/мл и протопорфирин IX 0.049 мг/мл) продемонстрировал результаты выше, чем у отдельно взятых астраленов и ПП IX. Максимальный результат соответствует 30 минутам и составляет 20.2% КОЕ для MSSA и 18.4% для MRSA. Увеличение количества ППХ в комплексе 2 до 0.12 мг/мл увеличило фотодинамический эффект по сравнению с комплексом 1. Так для MSSA наилучший результат составляет 13.2% КОЕ на 30 минутах, а для MRSA – 12.7 % также на 30 минутах

облучения. Данный результат можно объяснить тем, что большее число протопорфирина, в совокупности с астраленами, дает больший процент гибели КОЕ. Таким образом, точный выбор фотосенсебилизатора, а также времени процедуры позволяет подобрать курс лечения для каждого пациента индивидуально.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

ФДТ постепенно доказывает свою эффективность в борьбе с патогенными микроорганизмами. В настоящее время проводятся эксперименты с различными источниками излучения, а также различными фотосенсибилизаторами, интервалами, частотой обработки и т.д. Открытие, а также получение новых наночастиц дает все большие перспективы для этого метода. ФДТ выступает как альтернатива для пациентов, потерпевших неудачу при лечении традиционными способами, либо когда лечение антибиотиками не представляется возможным (лечение угревой сыпи у беременных). Также данный метод привлекателен из-за причины возрастания резистентности к антибиотиками у бактерий. Большинство мировых лабораторий и исследователей борются с этой проблемой. Однако, фотодинамическая терапия дает решение этой задачи. ФДТ воздействует на клетки микроорганизмов, не затрагивая генетический аппарат. Так же, несмотря на экономические и практические барьеры использования этого метода и требование избегать солнечного света в течение двух суток, использование этой терапии продолжает расти во всем мире, и есть надежда, что в скором времени произойдет включение протоколов лечения официальной медициной в практическое применение, и эти барьеры будут преодолены.

Данное исследование показывает важность и новизну данного метода. А также указывает на возможность использования гипсовых нанопленок в модификациях и использования астраленов как отдельно, так и в совокупности с протопорфирином IX.

ВЫВОДЫ

1. Модификация диоксида титана гипсовыми нанопленками показала значительный результат усиления фотодинамического эффекта, наилучшим результатом обладал комплекс пленок с добавлением палладия (для MSSA 13% на 30 мин и для MRSA 7% на 30 мин).

2. Астралены также показали значительный результат. Так для метициллин-чувствительного штамма *S. aureus* лучшим оказался результат 33,3% КОЕ на 30 минутах воздействия, а для метициллин-чувствительного штамма *S. aureus* самым значительным оказался результат в 39,7% КОЕ для 30 минутного воздействия. Что касается комплексов астраленов с протопорфирином IX, то здесь лучшим показателем стал комплекс 2 (астралены 0,6 мг/мл и ПП IX 0,12 мг/мл). Так у MSSA наблюдается снижение КОЕ до 13,2% после 30 минутного воздействия, а у MRSA снижение до 18,4% спустя 30 минут облучения.