

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

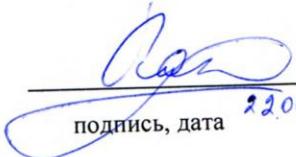
Кафедра биохимии и биофизики

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПОРФИРИНОВЫХ СОЕДИНЕНИЙ И
НАНОЧАСТИЦ ОКСИДОВ ЖЕЛЕЗА ПРИ ФОТОДИНАМИЧЕСКОМ
ВОЗДЕЙСТВИИ НА МИКРООРГАНИЗМЫ**

АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 2 курса 241 группы
Направления 06.04.01 – Биология
Биологического факультета
Корченовой Марии Владимировны

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


М.В. Каневский
подпись, дата 22.06.2017

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


Е.С. Тучина
подпись, дата 22.06.17

Заведующий кафедрой
д.б.н., профессор


С.А. Коннова
подпись, дата 23.06.2017

Введение

Актуальность темы. Успех фотодинамической терапии как в отношении раковых клеток, так и в отношении патогенных микроорганизмов зависит от удачного выбора фотосенсибилизатора [1-5]. В настоящее время идет активная разработка фотосенсибилизаторов нового поколения, отличающихся большим выходом синглетного кислорода и более эффективным образованием активных радикалов [6]. Основой для фотосенсибилизаторов нового поколения могут стать модифицированные порфириновые соединения и их комплексы с наночастицами оксида железа III.

Цель и задачи исследования. Целью настоящей работы стала оценка влияния порфириновых соединений и их комплексов с наночастицами оксида железа III при фотодинамическом воздействии синего (405 нм) светодиодного излучения на микроорганизмы.

Для достижения указанной цели были поставлены следующие задачи:

1. Оценить темновую токсичность четырех производных порфиринов на *Staphylococcus aureus* (антибиотико-чувствительный и антибиотико-устойчивый штаммы).
2. Изучить влияние синего (405 нм) светодиодного излучения на данные микроорганизмы.
3. Исследовать чувствительность микроорганизмов к комбинированному действию синего (405 нм) светодиодного излучения и порфириновых соединений.
4. Изучить влияние синего (405 нм) светодиодного излучения и наночастиц железа III на исследуемые бактерии.
5. Оценить влияние комплексов исследуемых металлопорфиринов с наночастицами оксида железа III при фотодинамическом действии синего (405 нм) излучения на микроорганизмы.

Материал и методы исследования. Экспериментальные исследования проводили на базе кафедры биохимии и биофизики Саратовского

национального исследовательского государственного университета имени Н. Г. Чернышевского в период с 2015 по 2017 гг.

В качестве исследуемых микроорганизмов были использованы метициллин-чувствительный штамм *Staphylococcus aureus* 209 P (MSSA) и метициллин-устойчивый *S. aureus* (MRSA) (ГИСК им. Л. А. Трасевича, г. Москва). Микроорганизмы выращивали при температуре 37°C на ГРМ-агаре (Россия, Оболенск). В качестве источника излучения использовали светодиод с максимумом спектра испускания $\lambda=405\pm 15$ нм и плотностью мощности 70 мВт/см². Во всех экспериментах режим излучения был непрерывный. Время облучения варьировали от 5 до 30 мин. В качестве фотосенсибилизаторов использовали порфириновые соединения, наночастицы оксида железа III и их комплексы в рабочих концентрациях 0,001, 0,01, 0,1 и 1 мг/мл. Эксперименты проводили по разработанному ранее протоколу [7]. Для статистической обработки экспериментальных данных использовали программы Statistica 6.0, Microsoft Excel 2010.

Структура и объём работы. Работа изложена на 70 страницах, включает в себя введение, 3 главы, заключение, выводы, список использованных источников. Работа проиллюстрирована 13 рисунками и 1 таблицей. Список использованных источников включает 99 наименований.

Научная новизна. Впервые исследовано влияние новых порфириновых соединений и их комплексов с наночастицами оксида железа III на антибиотико-чувствительный и антибиотико-устойчивый штаммы *S. aureus* при фотодинамическом воздействии синего (405 нм) светодиодного излучения.

Научная значимость. Полученные данные позволяют использовать исследуемые порфириновые соединения и их комплексы с наночастицами оксида железа III в качестве фотосенсибилизаторов и фотокатализаторов нового поколения при антимикробной фотодинамической терапии.

Положения, выносимые на защиту:

1. Используемые в работе соединения обладают низкой темновой токсичностью при использовании их в рабочих концентрациях.

2. Исследуемые порфириновые соединения в сочетании с комбинированным синим (405 нм) светодиодным излучением оказывают эффективное фотодинамическое воздействие на метициллин-чувствительный и метициллин-устойчивый штаммы *S. aureus*.

3. Одновременная обработка клеток исследуемых микроорганизмов комплексом, включающим фотосенсибилизатор (металлопорфирин) и фотокатализатор (наночастицы оксида железа III) позволяет увеличить фотодинамическое воздействие светодиодного синего (405 нм) излучения, при использовании сниженной концентрации фотосенсибилизатора.

Основное содержание работы

В главе «Обзор литературы» представлен анализ литературных данных о сущности и механизме метода фотодинамической терапии, об использовании синего излучения, о структурных особенностях, физико-химических свойствах и способах получения различных соединений, используемых в качестве фотосенсибилизаторов и фотокатализаторов при фотодинамическом воздействии.

В главе «Результаты исследования» изложены экспериментально полученные данные о влиянии порфириновых соединений и их комплексов с наночастицами оксида железа III при фотодинамическом воздействии синего (405 нм) излучения на исследуемые микроорганизмы.

В ходе исследования было установлено, что светодиодное синее излучение с длиной волны 405 нм оказывало незначительное подавляющее действие на рост микроорганизмов (не более 44% после 30 мин воздействия).

Низкая темновая токсичность является важным свойством фотосенсибилизатора при фотодинамической терапии, поэтому в ходе исследования было необходимо изучить этот параметр у исследуемых веществ. Было установлено, что наименьший токсический эффект на клетки стафилококка оказывали порфириновые соединения в концентрациях 0,001, 0,01 и 0,1 мг/мл (сокращение числа КОЕ в среднем не превышало 10%). Обработка

бактериальных клеток наночастицами Fe_2O_3 в концентрациях 0,01, 0,1 и 1 мг/мл оказывала незначительное снижение численности бактериальной популяции: при увеличении концентрации число бактериальных клеток снижалось от 98 до 90% по сравнению с контролем. Исследование комплексов металлопорфиринов с наночастицами оксида железа III показало, что низкой темновой токсичностью обладают комплексы с концентрацией 0,001 и 0,01 мг/мл (снижение числа КОЕ не превышало 10%).

Исходя из полученных данных, для дальнейших экспериментов были выбраны все три концентрации для наночастиц оксида железа III, концентрации 0,01 и 0,1 мг/мл для порфириновых соединений и концентрации 0,001 и 0,01 мг/мл для комплексов, т.к. они оказывали минимальный токсический эффект на бактериальные клетки без доступа света.

На следующем этапе было проведено изучение комплексного воздействия светодиодного излучения и исследуемых соединений на микроорганизмы.

Облучение чувствительного к антибиотику стафилококка в течение 5 мин после обработки 4-мя видами порфиринов в концентрации 0,01 мг/мл приводило к снижению численности бактериальной популяции на 11, 25, 81 и 87% соответственно. Дальнейшее увеличение времени от 10 до 30 минут снижало число КОЕ в среднем на 60-99%.

В ходе обработки метициллин-чувствительного стафилококка порфириновыми соединениями в концентрации 0,1 мг/мл было отмечено более выраженное сокращению числа КОЕ: облучение в течение первых 5 мин приводило к уменьшению бактериальной популяции на 60, 67, 86 и 90%. Дальнейшее увеличение времени от 10 до 30 мин снижало число КОЕ в среднем на 91-99%.

Сходное действие оказывали порфириновые соединения на устойчивый к антибиотику штамм стафилококка: при концентрации 0,01 мг/мл в течение первых 5 мин излучения наблюдалось уменьшение численности бактериальных колоний на 22, 30, 88 и 83% в зависимости от типа порфирина. Дальнейшее

увеличение времени излучения от 10 до 30 минут снижало число КОЕ в среднем на 61-99%.

Концентрация 0,1 мг/мл приводила к гибели микроорганизма на 60, 67, 90 и 87% в течение первых 5 мин экспозиции. Дальнейшее увеличение времени облучения от 10 до 30 мин снижало число КОЕ в среднем на 90-99%.

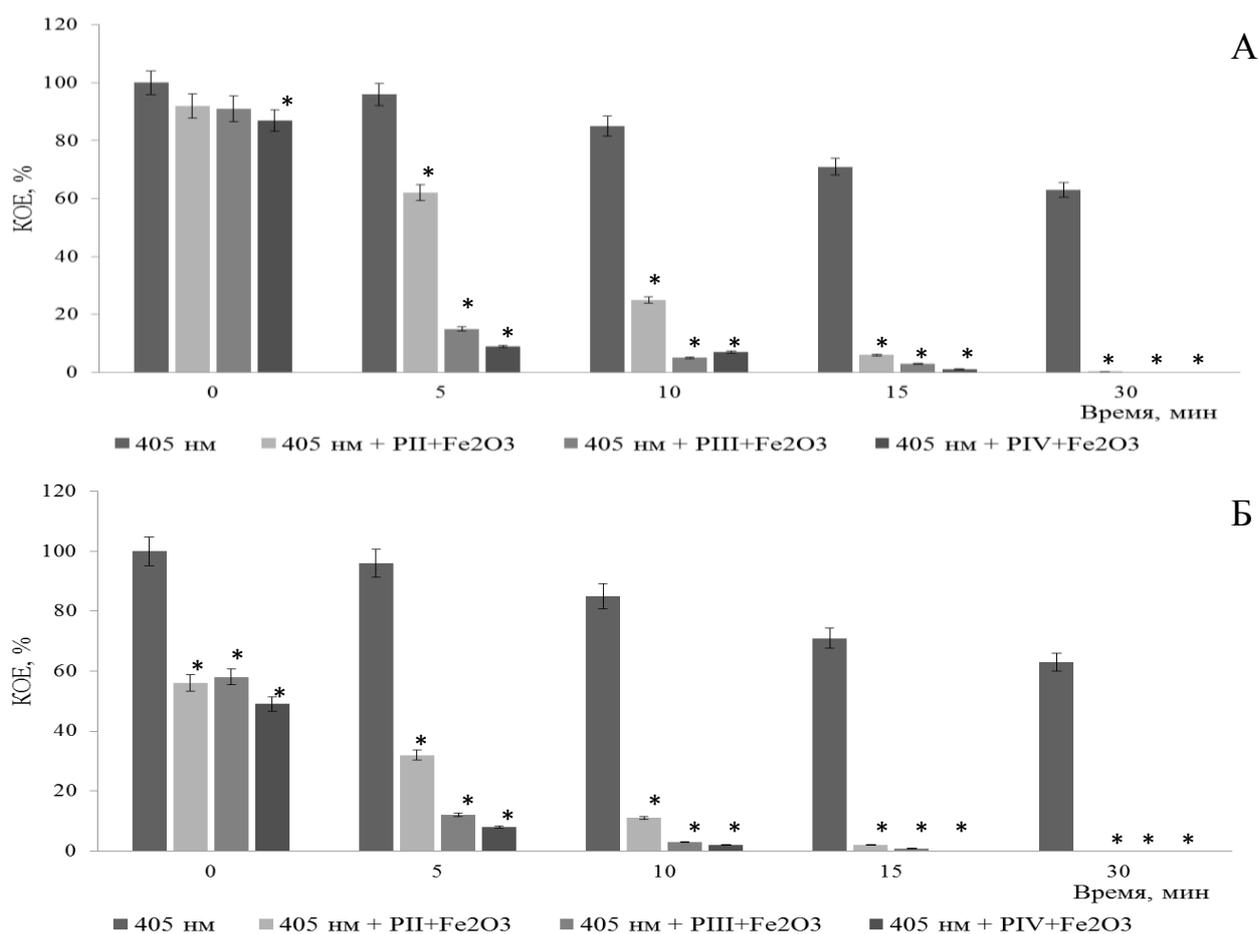
При использовании оксида железа III в концентрации 0,01 мг/мл в качестве фотокатализатора при фотодинамическом воздействии синего (405 нм) излучения на клетки MSSA показатели КОЕ через 5 мин облучения снижались незначительно. При увеличении времени излучения от 10 до 15 мин уровень выживаемости составлял 65 и 48% соответственно. Увеличение времени излучения до 30 мин оказывало наиболее существенное влияние: уровень выживаемости MSSA составил 32%. Обработка бактериальных клеток наночастицами в концентрации 0,1 мг/мл приводил к снижению числа КОЕ до 67% после 10 мин облучения. Дальнейшее увеличение времени излучения от 15 до 30 мин уменьшал бактериальную популяцию до 40 и 25% соответственно. Наибольший фотокаталитический эффект был установлен при использовании наночастиц оксида железа III в концентрации 1 мг/мл. Уровень выживаемости через 10 мин облучения оставался еще довольно высоким (70%), но при увеличении времени до 15 мин показатель снизился до 23%, а через 30 мин до 12%. При использовании комбинированного воздействия синего (405 нм) светодиодного излучения на клетки MRSA были продемонстрированы схожие результаты.

В ходе исследования была проведена оценка чувствительности 2-х штаммов *S. aureus* к комбинированному воздействию синего (405 нм) светодиодного излучения и комплексам исследуемых металлопорфиринов и наночастиц оксида железа III (рисунок 1).

При обработке клеток метициллин-чувствительно штамма стафилококка комплексами в концентрации 0,001 мг/мл на первых 5 мин излучения было отмечено сокращение числа КОЕ на 62% (PII+Fe₂O₃), на 85% (PIII+ Fe₂O₃) и на 91% (PIV+ Fe₂O₃) (рисунок 1 А). Увеличение времени экспозиции от 10 мин до

15 мин сокращало численность бактериальной популяции в среднем от 87 до 97% соответственно. Увеличение времени излучения до 30 мин приводило к почти полной гибели микроорганизма (рисунок 1 А).

Еще более сильный бактерицидный эффект на MSSA наблюдали при обработке клеток комплексами концентрацией 0,01 мг/мл (рисунок 1 Б): так, уже на первых 5 мин облучения было отмечено резкое уменьшение количества бактериальных клеток при использовании всех комплексов (снижение КОЕ для PII+Fe₂O₃ на 68%, для PIII+Fe₂O₃ на 88% и для PIV+Fe₂O₃ на 92%). Дальнейшее увеличение времени облучения от 10 до 30 мин приводило к гибели клеток стафилококка на 94-100% (рисунок 1 Б).

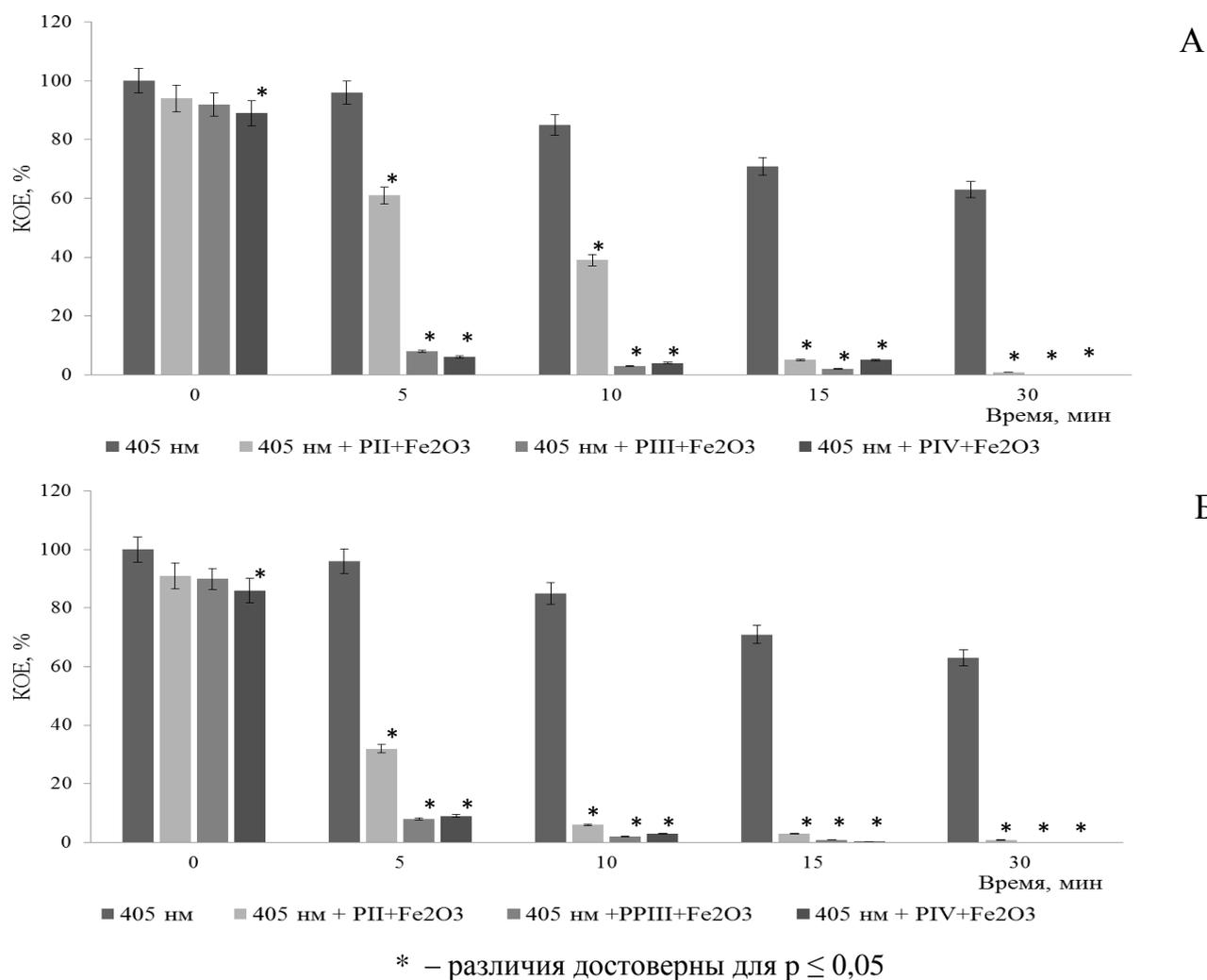


* – различия достоверны для $p \leq 0,05$

Концентрация комплексных соединений: А – 0,001%, Б – 0,01%

Рисунок 1 – Изменение численности MSSA при воздействии синего (405 нм) светодиодного излучения и комплексов порфириновых соединений с наночастицами оксида железа III.

Сходное действие оказывали комплексные соединения на устойчивый к антибиотику штамм стафилококка (рисунок 2). Так, использование комплексов в концентрации 0,01 мг/мл на первых 5 мин излучения уменьшало численность бактериальной популяции на 39% при использовании комплекса PII+Fe₂O₃, на 92% – PIII+Fe₂O₃ и на 94% – PVI+Fe₂O₃ (рисунок 2 А).



Концентрация комплексных соединений: А – 0,001%, Б – 0,01%

Рисунок 2 – Изменение численности при воздействии синего (405 нм) светодиодного излучения и комплексов порфириновых соединений с наночастицами оксида железа III.

При увеличении времени облучения до 10 мин комплекс PII+Fe₂O₃ снижал число КОЕ на 61%, комплексы PIII+Fe₂O₃ и PVI+Fe₂O₃ на 97 и 96% соответственно. Увеличение времени экспозиции от 15 до 30 мин в среднем увеличивало гибель организма до 97-100% соответственно (рисунок 2 А). Увеличение концентрации комплексов до 0,01 мг/мл усиливало бактерицидный эффект фотодинамического воздействия и через 15 мин излучения снижало число КОЕ в среднем до 99%. Дальнейшее увеличение времени воздействия до 30 мин приводило к полной гибели стафилококка (рисунок 2 Б).

Заключение

Анализируя полученные результаты, можно заключить, что исследуемые порфириновые соединения и их комплексы с наночастицами оксида железа III в сочетании с источником излучения ($\lambda=405\pm 15$ нм) обеспечивали эффективную деструкцию исследуемых микроорганизмов. При этом снижение численности бактерий во всех случаях носило дозозависимый характер. Наиболее выраженное подавление численности микроорганизмов наблюдалось при максимальной рабочей концентрации и 30 минутном облучении при заданной плотности мощности излучения 70 мВт/см².

В работе были использованы новые катионные порфирины и металлопорфирины, имеющие ряд существенных отличий от других порфиринов. Наиболее важное отличие заключается в том, что активные гидроксипропил- и бутил- периферические группы (-R) соединений могут связываться в 3-м или 4-м положении пиридинового кольца, а также что эти группы могут иметь разную степень гидрофобности.

В ходе данного исследования было установлено, что исследуемые порфириновые соединения имеют высокую эффективность при использовании их в качестве фотосенсибилизаторов в фотодинамической терапии, вызывая сокращение численности бактериальных популяций. Наибольшую

эффективность при этом демонстрировали PIII и PIV: при их использовании снижение числа КОЕ микроорганизмов достигало 98% и даже 100%.

Также было изучено влияние оксида железа III в качестве фотокатализатора при фотодинамическом воздействии на клетки исследуемых организмов. Наибольшее снижение числа КОЕ (на 78%) было установлено при использовании наночастиц оксида железа III в концентрации 1 мг/мл и времени излучения равном 30 мин.

Одновременная обработка клеток исследуемых организмов комплексом, включающим фотосенсибилизатор и фотокатализатор, оказала наиболее эффективное фотодинамическое воздействие. При этом в качестве фотосенсибилизатора использовали исследуемые металлопорфирины, а в качестве фотокатализатора наночастицы оксида железа. Данный способ обеспечил эффективную инактивацию микроорганизмов при использовании сниженной концентрации фотосенсибилизатора за счет одновременного использования фотокатализатора и фотосенсибилизатора: увеличение времени до 30 мин практически полностью (99,2-100%) убивало стафилококк при использовании всех разновидностей комплексов.

Уменьшение численности бактерий при комбинированном действии синего (405 нм) света и металлопорфиринов и их комплексов с наночастицами оксида железа III для MSSA и MRSA носило сходный характер. Таким образом, разработанный метод может быть использован для эффективного уничтожения бактерий с разной степенью устойчивости к антибиотикам.

Выводы

1. Установлено, что облучение синим (405 нм) светом в течение 30 мин приводит к сокращению численности антибиотико-чувствительного штамма *S. aureus* на 44%, антибиотико-устойчивого штамма *S. aureus* – на 40%.
2. Показано, что выраженным токсическим действием (гибель до 50% микробной популяции) обладают порфириновые соединения в концентрации

1 мг/мл; использование порфиринов в концентрации 0,001 мг/мл не вызывало выраженного токсического действия на исследуемые микроорганизмы.

3. Выявлено, что порфирины I и II были менее эффективны при фотодинамическом воздействии синего светодиодного излучения на стафилококки в течение 5-10 мин (снижение числа КОЕ на 60-80%) по сравнению с порфиринами III и IV (снижение числа КОЕ на 83-95%). Эффективное подавление численности стафилококков (до 99,9% числа КОЕ) достигается после 30 мин облучения с использованием всех типов порфиринов.

4. При изучении комбинированного действия светодиодного синего излучения и наночастиц оксида железа III было показано, что клетки метициллин-чувствительного штамма *S. aureus* более чувствительны к обработке наночастицами (снижение числа КОЕ в среднем на 70% для разных концентраций) по сравнению с метициллин-устойчивым штаммом *S. aureus* (снижение числа КОЕ в среднем на 67%).

5. Использование комплексов порфириновых соединений с наночастицами оксида железа III дало существенное повышение эффективности фотодинамического воздействия: все три использованные комплексы оказывали 100% бактерицидный эффект при концентрации 0,01 мг/мл и 30 минутном воздействии излучения.

Список использованных источников

1. Bonnett, R. Photosensitizers of the porphyrins and phthalocyanine series for photodynamic therapy / R. Bonnett // Chem. Soc. Rev. 1995. V. 24. P. 19-33.
2. Bactericidal effect of photodynamic inactivation against methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* is strain-dependent / M. Grinholc [et al.] // Journal of Photochemistry and Photobiology. 2008. V. 90, № 1. P. 57-63.

3. Malik, Z. Photodynamic inactivation of Gram -negative bacteria: problems and possible solutions / Z. Malik, H. Ladan, Y. Nitzan // Journal of Photochemistry and Photobiology. 1992. V. 14. P. 262-266.
4. Wainwright, M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy / M. Wainwright // J. Antimicrob. Chemotherapy. 1998. V. 42. P. 13-28.
5. Фотодинамическая терапия. История создания метода и ее механизмы / А. В. Гейниц [и др.] // Лазерная медицина. 2007. Т. 11, Вып. 3. С. 42-46.
6. Abrahamse, H. New photosensitizers for photodynamic therapy / H. Abrahamse, M. R. Hamblin // Biochem J. 2016. V. 473. P. 347-364.
7. Фотодинамическое воздействие красного (625 нм) излучения на бактерии вида *Propionibacterium acnes*, обработанные фотосенсибилизатором / Е. С. Тучина [и др.] // Естественные и технические науки. 2008. Т. 34, № 2. С. 90-93.

Mark