

МИНОБРНАУКИ РОССИИ

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования

**«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»**

Кафедра биохимии и биофизики

**ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ БИОПЛЕНОК МИКРООРГАНИЗМОВ К
ФОТОДИНАМИЧЕСКОМУ ВОЗДЕЙСТВИЮ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
СВЕТОДИОДНОГО СИНЕГО (405 НМ) ИЗЛУЧЕНИЯ**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 4 курса 421 группы

Направления подготовки бакалавриата 06.03.01 Биология

Биологического факультета

Соколовой Елизаветы Вадимовны

Научный руководитель

доцент, канд. биол. наук

подпись, дата

Е. С. Тучина

Зав. кафедрой биохимии и

биофизики,

док. биол. наук, профессор

подпись, дата

С.А. Коннова

Саратов 2026

Введение. В настоящее время фотодинамическая терапия (ФДТ) набирает популярность как эффективная альтернатива антибиотикам в лечении бактериальных инфекций. Рассматривая данные за последние десятилетия, мы можем прийти к выводу, что многие виды бактерий становятся устойчивыми к терапии антибиотиками, в том числе и штаммы вида *Staphylococcus aureus* и *Staphylococcus epidermidis*.

Бактериальные биопленки представляют особую опасность в клинической практике, поскольку обеспечивают микроорганизмам повышенную устойчивость не только к антибиотикам, но и к иммунной системе организма. *S. aureus* – один из наиболее распространенных продуцентов биопленок, способный вызывать хронические и рецидивирующие инфекции различной локализации.

В отличие от традиционных антибиотиков, ФДТ способна эффективно разрушать биопленки за счет локальной генерации активных форм кислорода (АФК), обладающих выраженным цитотоксическим действием, что делает перспективным методом в борьбе с устойчивыми и хроническими инфекциями. Данный метод является неинвазивным и уже находит применение в таких областях медицины, как гинекология, стоматология, дерматология, урология и терапия онкологических заболеваний.

Спекл-микроскопия представляет собой современный неинвазивный оптический метод исследования, позволяющий оценивать структуру биопленок без их разрушения и дополнительного окрашивания. Метод основан на анализе спекл-картины, формирующейся при рассеянии когерентного лазерного излучения исследуемым объектом. Особый интерес применение спекл-микроскопии представляет при изучении эффективности фотодинамических воздействий, поскольку она позволяет количественно оценивать изменения морфологии биопленок, такие как толщина, однородность и фрагментация. Это делает метод перспективным инструментом для мониторинга структурных изменений биопленок и оценки эффективности

антимикробных воздействий.

С учетом роста антибиотикорезистентности ФДТ рассматривается как перспективное направление в современной антимикробной терапии, способное расширить количество эффективных методов борьбы с инфекциями.

Целью данной работы являлось изучение фотодинамического воздействия светодиодного излучения синего спектра на способность биопленкообразования у бактерий рода *Staphylococcus*.

Задачи:

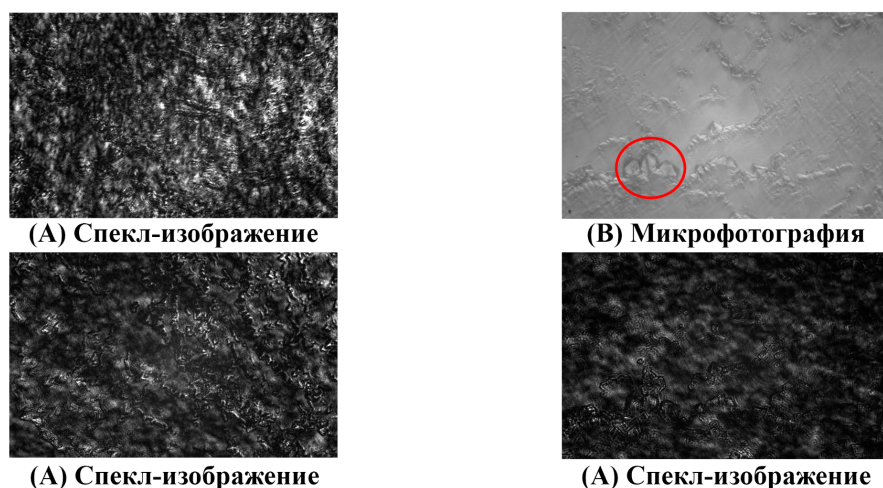
1. Сравнить чувствительность клеток стафилококков, находящихся в суспензии, к действию синего (405, 428 нм) излучения;
2. Оценить чувствительность биопленок стафилококков к действию синего (405, 428 нм) излучения классическим методом;
3. Адаптировать методику спекл-микроскопии для визуализации изменений биопленок стафилококков после воздействия синего (405 нм) излучения;
4. Проанализировать с помощью метода спекл-микроскопии изменения, происходящие с биопленками стафилококков в течение первых 12-18 ч после фотодинамического воздействия синего (405 нм) излучения.

Структура бакалаврской работы. Работа состоит из введения, основной части, заключения, выводов, списка использованных источников. Литературный обзор основан на анализе 44 научных источников и посвящен рассмотрению современных представлений о фотоинаktivации микроорганизмов с использованием синего света, особенностей формирования и свойств биопленок стафилококков, методов оценки антимикробной эффективности, а также современных подходов к исследованию биопленок. Отдельное внимание уделено методу спекл-микроскопии как перспективному способу визуализации и количественной оценки структурных изменений биопленок под воздействием фотоинаktivации.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Были проведены количественный и качественный анализы воздействия синего света (405-428 нм) на бактериальные клетки штаммов *Staphylococcus aureus* и *Staphylococcus epidermidis* для изучения подавления способности к биопленкообразованию, а также адаптации методов спекл-микроскопии.

Адаптировали метод спекл-микроскопии через подбор оптимальной среды для фиксирования этапов роста биопленки, а также выявления правильной жидкости для разведения бактериальной суспензии для последующего посева. Использование 3%-го голодного агар обеспечивает оптимальные условия для регистрации начальных этапов роста биопленок, позволяя визуализировать изменения, возникающие под действием синего излучения. Кристаллы солей физиологического раствора влияли на качество спекл-изображений.



(A) спекл-изображение; (B) микрофотография, на которой красным контуром обведены кристаллы соли.

Рисунок 1 – Сравнение результатов по визуализации биопленки *S. epidermidis* при разведении 10^5 м.к./мл на голодном агаре

Количественный анализ выявил, что снижение к способности к биопленкообразованию у бактерий зависит от времени экспозиции и длине волны излучаемого света. Для *S. epidermidis* при облучении светом с длиной волны 405 нм наблюдалось снижение жизнеспособности планктонных клеток,

наиболее выраженное после 30 мин воздействия. При использовании излучения 428 нм также отмечалось уменьшение показателей бактериальной взвеси, тогда как изменения биопленкообразования были менее выражены. Для *S. aureus* наиболее заметное снижение способности к образованию биопленки зарегистрировано после 15 мин облучения светом с длиной волны 405 нм. При воздействии 428 нм различия между биопленкой и бактериальной взвесью были менее выражены, что свидетельствует о более низкой эффективности данной длины волны.

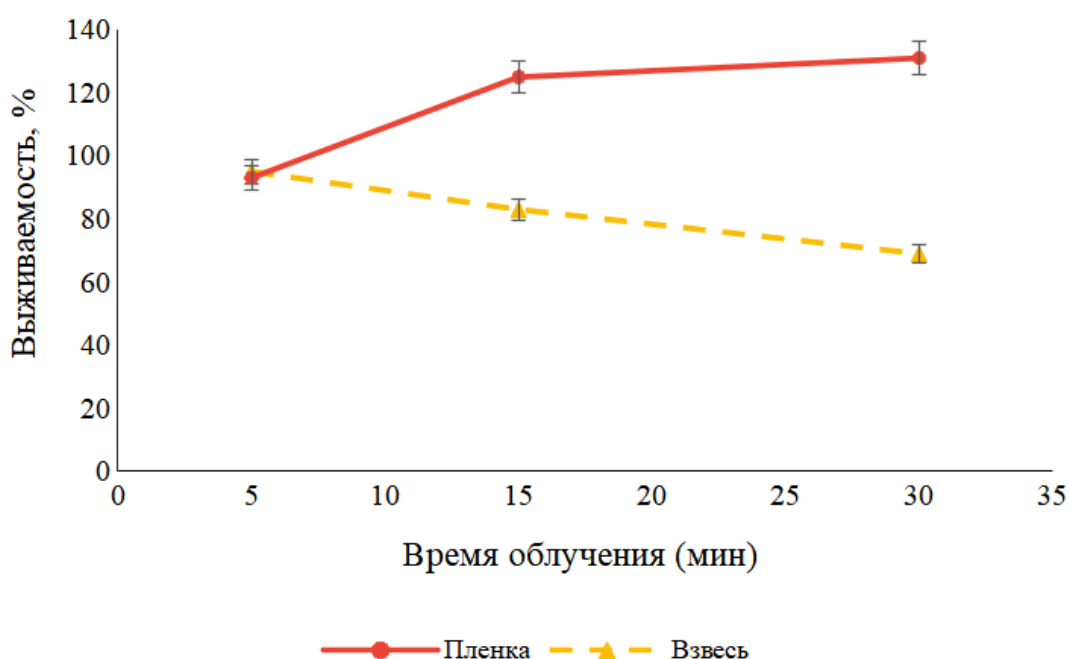


Рисунок 2 – Чувствительность клеток *S. epidermidis* к фотодинамическому воздействию синего (405 нм) излучения

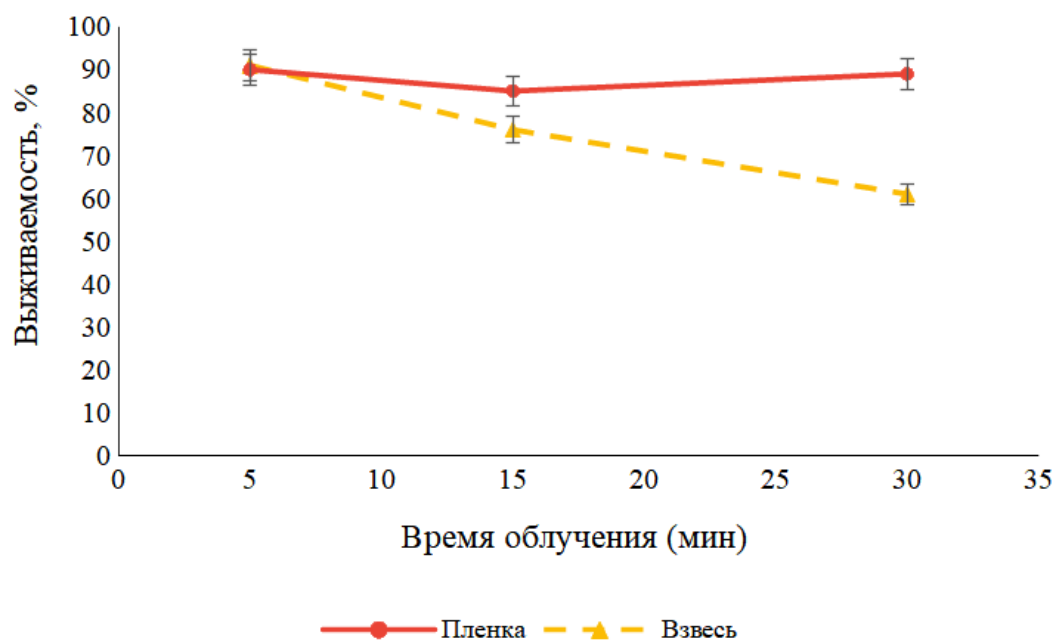


Рисунок 3 – Чувствительность клеток *S. epidermidis* к фотодинамическому воздействию синего (428 нм) излучения

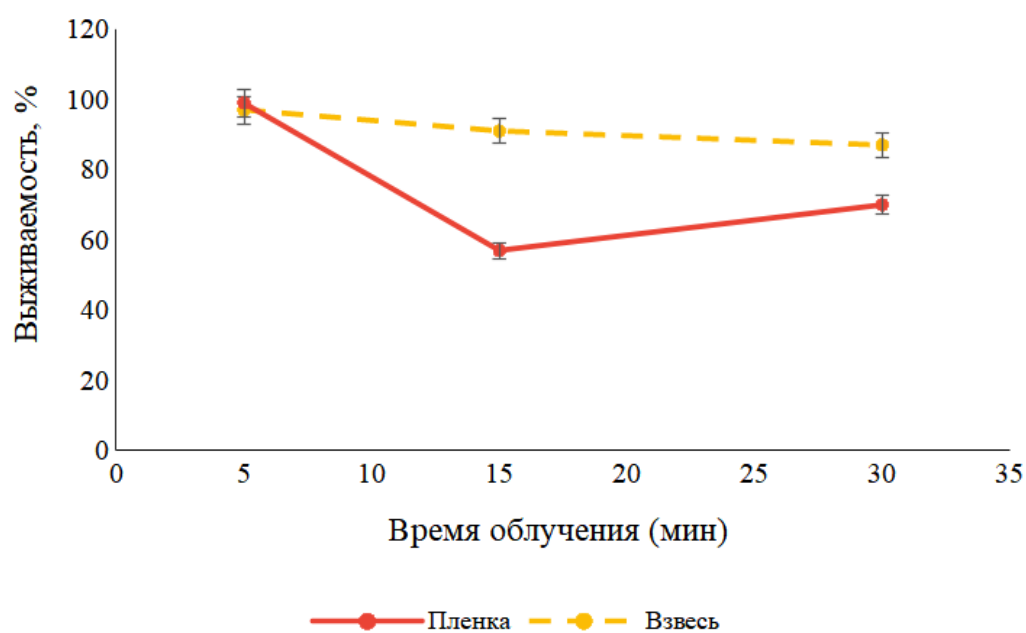


Рисунок 4 – Чувствительность клеток *S. aureus* к фотодинамическому воздействию синего (405 нм) излучения

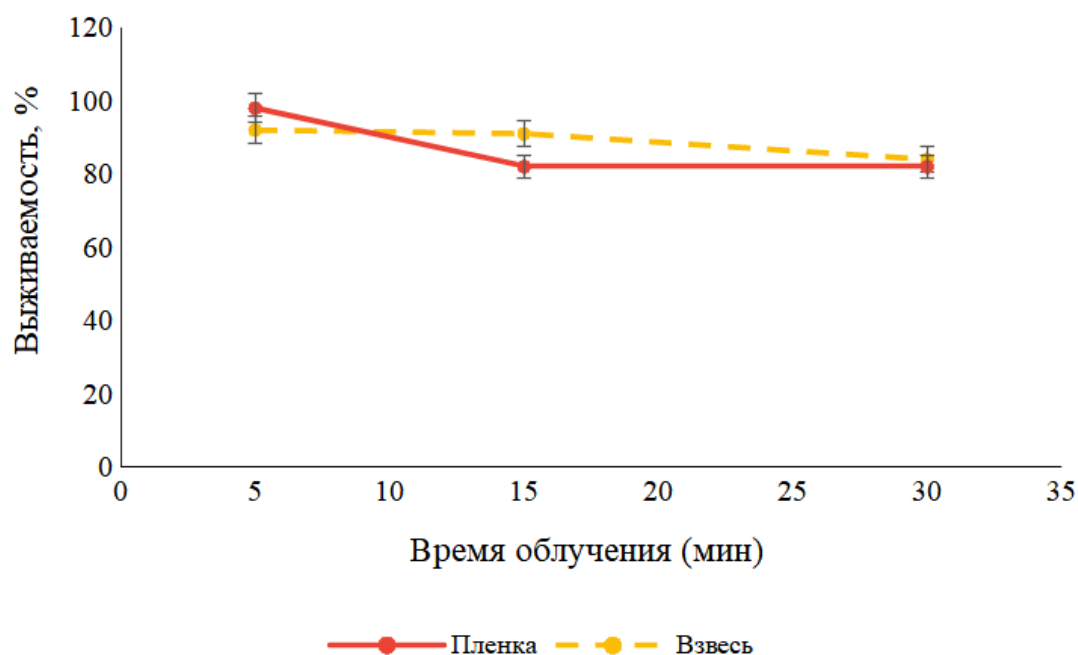


Рисунок 5 – Чувствительность клеток *S. aureus* к фотодинамическому воздействию синего (428 нм) излучения

Для оценки структурных изменений биопленок после фотодинамического воздействия использовали метод спекл-микроскопии. Анализ относительной толщины биопленок показал уменьшение данного показателя по сравнению с контролем у штаммов *S. aureus* и *S. epidermidis*. Наиболее выраженное снижение наблюдалось после 30-минутного воздействия и сохранялось на протяжении всего периода наблюдения. Анализ относительной фрагментарности биопленок продемонстрировал сниженное заращение после облучения, по сравнению с контролем. Максимальные значения фрагментарности также регистрировались после 30 мин воздействия. Полученные данные свидетельствуют о подавлении формирования биопленок и уменьшении накопления бактериальной массы под действием синего излучения.

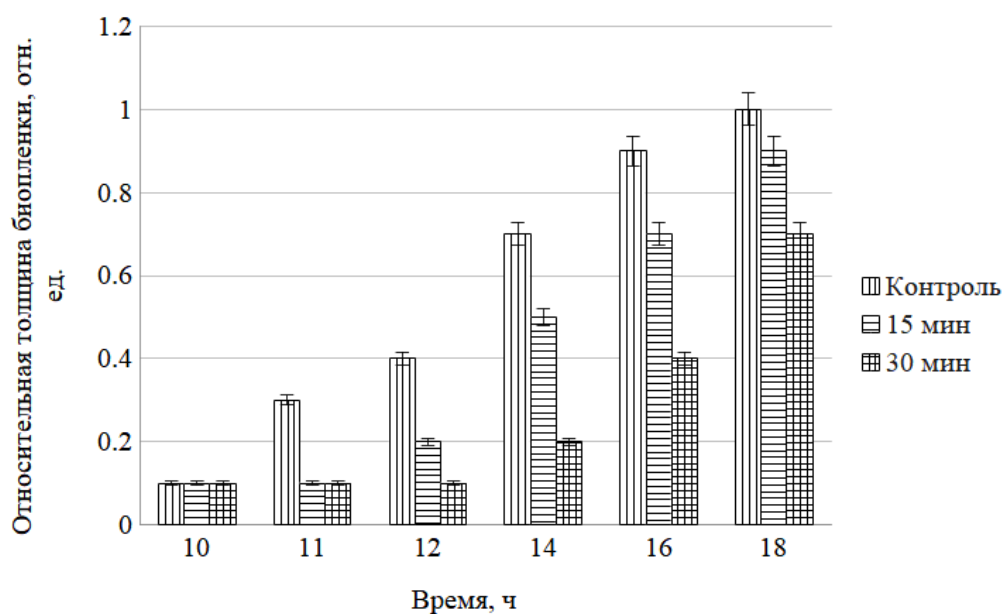


Рисунок 6 – Динамика изменения относительной толщины биопленки *S. aureus*, зарегистрированная с помощью спекл-микроскопии

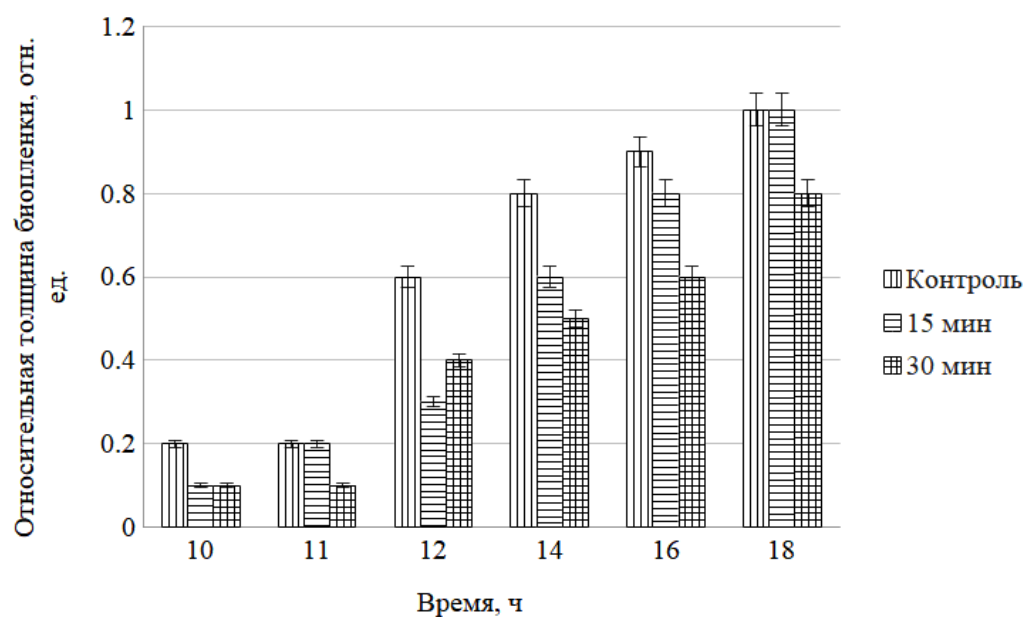


Рисунок 7 – Динамика изменения относительной толщины биопленки *S. epidermidis*, зарегистрированная с помощью спекл-микроскопии

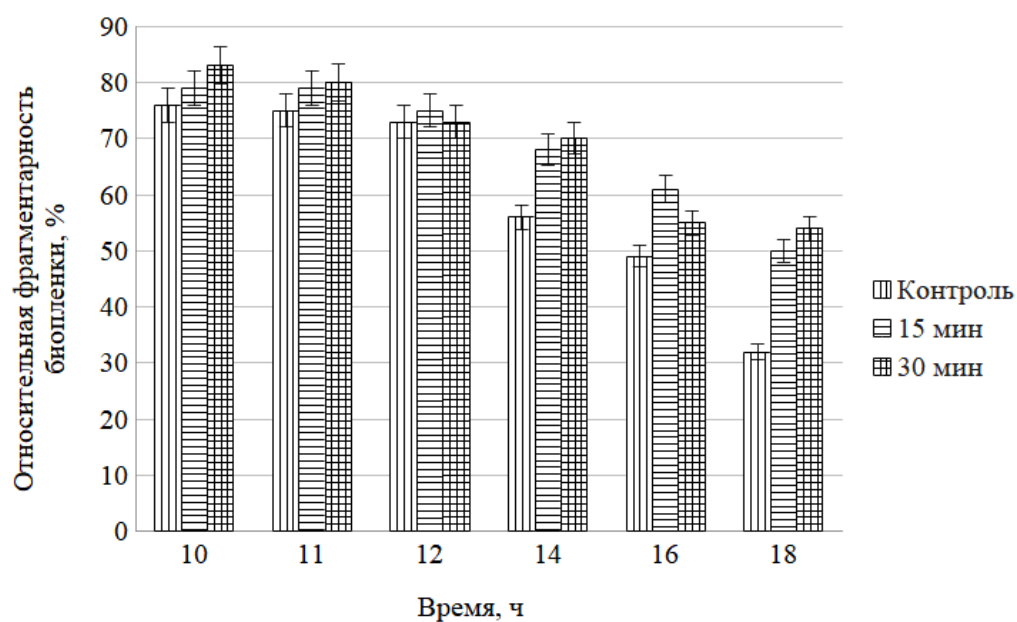


Рисунок 8 – Динамика изменения относительной фрагментарности биопленки *S. aureus*, зарегистрированная с помощью спекл-микроскопии

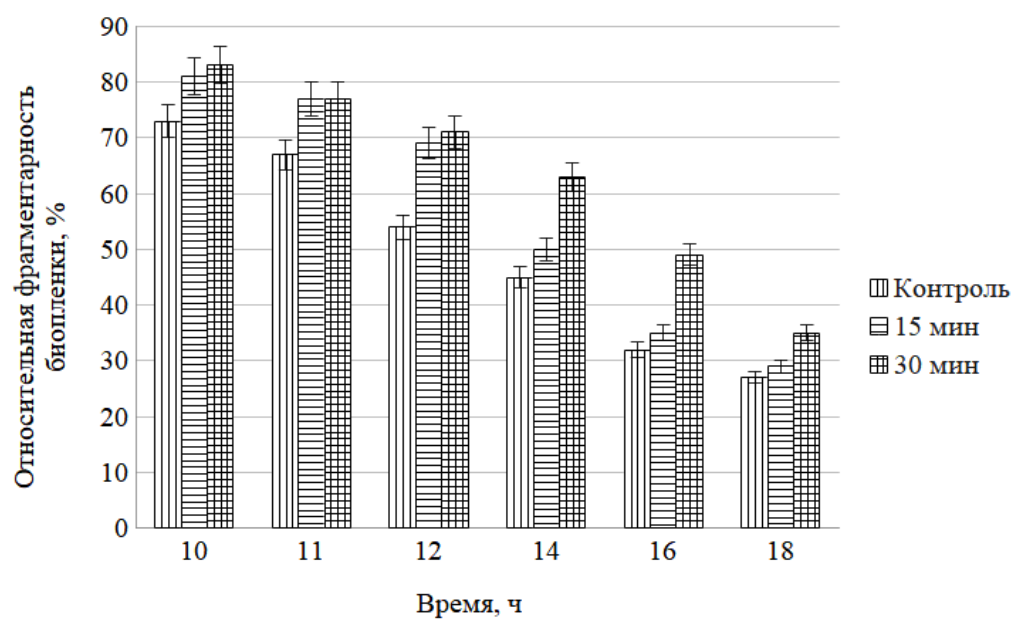


Рисунок 9 – Динамика изменения относительной фрагментарности биопленки *S. epidermidis*, зарегистрированная с помощью спекл-микроскопии

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе работы была адаптирована методика спекл-микроскопии для исследования ранних стадий формирования бактериальных биопленок после фотодинамического воздействия. Было установлено, что использование 3%-го голодного агара обеспечивает оптимальные условия для регистрации начальных этапов роста биопленок, позволяя визуализировать изменения, возникающие под действием синего излучения. При этом выявлено влияние кристаллизации солей физиологического раствора на качество спекл-изображений, что необходимо учитывать при дальнейшей оптимизации методики.

Также была выполнена оценка влияния фотодинамической инактивации с использованием синего света с длинами волн 405 и 428 нм на способность штаммов *S. epidermidis* и *S. aureus* к биопленкообразованию. Полученные результаты показали, что воздействие синего света оказывает различное влияние на исследуемые микроорганизмы и зависит как от длины волны, так и от времени облучения.

Наиболее выраженное снижение способности к образованию биопленки наблюдалось у *S. aureus*. При этом минимальные показатели биопленки фиксировались на ранних временных точках (15 минут для 405 и 428 нм), тогда как показатели бактериальной взвеси оставались относительно высокими. Это может свидетельствовать о том, что воздействие синего света в первую очередь влияет на процессы адгезии и формирования биопленочной структуры, а не только на общую жизнеспособность клеток.

Для *S. epidermidis* результаты оказались менее однозначными. При воздействии 405 нм отмечалось повышение биопленкообразования уже через 15 минут облучения, однако при 428 нм различия между биопленкой и бактериальной взвесью были выражены значительно слабее. Полученные данные указывают на возможные межвидовые различия чувствительности стафилококков к воздействию синего света.

Результаты исследования хорошо согласуются с литературными данными по фотоинаktivации биопленок с использованием синего света, в частности с работами, посвященными воздействию 405 нм на *P. aeruginosa*. Аналогично опубликованным исследованиям, в данной работе также наблюдалось снижение биопленкообразования после облучения. Однако, в отличие от большинства существующих исследований, сосредоточенных преимущественно на грамотрицательных бактериях и длине волны 405 нм, в настоящей работе изучалось воздействие двух длин волн на грамположительные микроорганизмы – *S. epidermidis* и *S. aureus*.

Анализ спекл-изображений позволил количественно оценить изменения относительной толщины и фрагментарности биопленок в процессе их формирования. После фотодинамического воздействия наблюдалось снижение относительной толщины биопленок и сохранение более высокой фрагментарности по сравнению с контролем, особенно после 30-минутного облучения. Полученные данные свидетельствуют о замедлении формирования биопленочной структуры под действием синего света и подтверждают перспективность спекл-микроскопии как неразрушающего метода мониторинга ранних изменений биопленок.

Таким образом, полученные результаты подтверждают перспективность применения синего света в качестве метода подавления биопленкообразования. Работа расширяет существующие представления о фотодинамической инаktivации грамположительных бактерий и демонстрирует возможность селективного воздействия на процессы формирования биопленки даже при относительно сохраненной планктонной формы. Вместе с тем выявленные различия между штаммами и длинами волн подчеркивают необходимость дальнейшего изучения механизмов фотоинаktivации и оптимизации параметров облучения.

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что чувствительность клеток стафилококков, находящихся в суспензии, к действию синего (405, 428 нм) излучения зависит от времени экспозиции и длины волны излучения: для *S. aureus* максимальный эффект – снижение численности до 57% – отмечен при длине волны 405 нм и времени экспозиции 15 мин. Напротив, у *S. epidermidis* наибольшее снижение выживаемости – до 61% – наблюдалось при использовании длины волны излучения 428 нм и времени экспозиции 30 мин;

2. Показано, что наибольшая чувствительность (на 61 %) к синему излучению характерная для биопленок *S. epidermidis* при использовании длины волны излучения 428 нм, в отличие от *S. aureus*, который оказался более устойчивым к данному типу излучения;

3. В ходе апробации методики спекл-микроскопии для оценки нарастания биопленок стафилококков было установлено, что оптимальной средой для культивирования является 3% голодный агар, разведение бактериальной суспензии необходимо производить в дистиллированной воде;

4. Анализ изменений, происходящих с биопленками стафилококков в течение первых 12-18 ч после фотодинамического воздействия синего (405 нм) излучения, с помощью метода спекл-микроскопии изменения выявил, что после 30-минутного воздействия толщина биопленки *S. aureus* составляла 0.6 отн. ед., а фрагментарность составляла около 60%.