

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

Кафедра биохимии и биофизики

МЕТОДЫ ОЦЕНКИ РЕЗИСТЕНТНОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ  
К ФОТОДИНАМИЧЕСКОМУ ВОЗДЕЙСТВИЮ

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 4 курса 421 группы

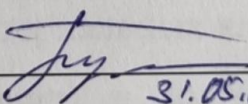
Направления подготовки бакалавриата 06.03.01 Биология

Биологического факультета

Эль Хих Айи Нидаль

Научный руководитель:

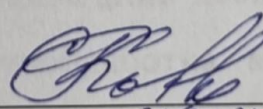
доцент, канд. биол. наук

  
31.05.24  
дата, подпись

Е.С. Тучина

Зав. кафедрой:

профессор, док. биол. наук

  
31.05.24  
дата, подпись

С.А. Коннова

## Введение

**Актуальность темы.** Золотистый стафилококк является одним из наиболее распространенных патогенов и возбудителем различных видов инфекционных заболеваний. Последние десятилетия характеризуются возрастающей устойчивостью клинически значимых микроорганизмов, в том числе бактерий рода *Staphylococcus*, к различным антибактериальным препаратам. В связи с этим необходим поиск альтернативных методов лечения, к которым бактерии не смогут сформировать резистентность.

Во всем мире разрабатываются подходы по предотвращению появления полностью резистентных и неизлечимых антибиотиками инфекций. Одной из многообещающих альтернатив является антимикробная фотодинамическая терапия (АФДТ), метод, который основан на генерации активных форм кислорода (АФК) при взаимодействии красителей и света.

АФДТ демонстрирует антимикробный эффект для клеток большинства клинически значимых микроорганизмов, а также обладает иммуномодулирующим и регенеративным потенциалом при воздействии на ткани макроорганизма. Важным достоинством метода является его низкая себестоимость, окупаемость и удобство проведения процедуры.

Повреждающий эффект АФДТ связан с многоточечным воздействием АФК на компоненты бактериальных клеток (клеточную стенку, белки, липиды и генетический материал), и долгое время считалось, что лечение на основе света имеет низкий риск развития толерантности и/или резистентности. Тем не менее, самые последние исследования показывают, что повторяющаяся сублетальная фотообработка может спровоцировать развитие толерантности у патогенных микроорганизмов.

### **Цель и задачи исследования.**

Разработать комплексный подход для оценки возможного развития толерантности бактерий *Staphylococcus aureus* фотодинамическому воздействию светодиодного фиолетового (405 нм) излучения.

Для достижения поставленной цели решали следующие задачи:

1. На основе литературных данных сформировать комплекс методов и разработать схему изучения феномена толерантности бактерий *S. aureus* к светодиодному фиолетовому (405 нм) излучению.

2. Оценить изменение культуральных свойств изучаемых микроорганизмов и динамику их численности при многократном воздействии светодиодного фиолетового (405 нм) излучения.

3. Определить минимальную ингибирующую концентрацию перекиси водорода и возникновение толерантности к ней у бактерий *S. aureus* при многократном воздействии светодиодного фиолетового (405 нм) излучения.

4. Выявить изменения в активности бактериальной каталазы А в клетках *S. aureus* при многократном воздействии светодиодного фиолетового (405 нм) излучения.

### **Материалы и методы исследования.**

В качестве тест-культуры для проведения исследований использовали клинический штамм *S. aureus* 2a, предоставленный музеем кафедры микробиологии и вирусологии СГМУ им. В.И. Разумовского. Данный штамм характеризовался способностью продуцировать плазмокоагулазу, гемолизин и летициназу, при этом обладал устойчивостью к таким антибиотикам как амоксициллин и ванкомицин. При постановке опытов использовали суточную бактериальную культуру, выращенную при температуре 37°C на универсальной питательной среде (ГРМ-агар или ГРМ-бульон, г. Оболенск, Россия).

Источником светодиодного фиолетового излучения (СИ) служил светодиодный прибор с максимумом спектра испускания  $\lambda=405\pm 30$  нм, плотностью мощности 80 мВт/см<sup>2</sup>. За 1 цикл облучения принимали однократное облучение бактериальной суспензии в течение 15 мин, сообщаемая доза излучения 72 Дж/см<sup>2</sup>.

Для создания асептических условий в ходе эксперимента использовали стерильный черный полистирольный 96-луночный планшет; источник излучения располагали над ячейками планшета. При постановке опытов брали культуру *S. aureus 2a*, предварительно выращенную в течение 24 ч при температуре 37 °С на плотной питательной среде. Бактериальную взвесь готовили в стерильном физиологическом растворе методом последовательных десятикратных разведений; конечная концентрация составляла 10<sup>3</sup> микробных клеток (м.к.) в 1 мл. Контрольные образцы взвеси инкубировали в течение 15 мин без доступа света. Бактериальную взвесь из конечного разведения 10<sup>3</sup> м.к./мл вносили в ячейки планшета в объеме 0,1 мл.

По истечении времени воздействия источник лазерного излучения отключали, взвеси бактерий из данных ячеек переносили на чашки Петри с плотной питательной средой и равномерно распределяли по поверхности стерильным шпателем. Учет результатов проводили путем подсчета числа колониеобразующих единиц (КОЕ) через 24 часа после инкубации при 37°С. Выжившие (опытные) колонии использовали для подготовки инокулята для следующего экспериментального цикла.

Учет изменения численности (КОЕ, %) бактериальных популяций проводили в каждом цикле облучения, определение минимальную ингибирующую концентрацию H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и активности каталазы в 0, 10, 15 и 20 циклах. В ходе данных исследований работали с суточной культурой, предварительно выращенной из изолированной колонии.

При работе со светодиодным излучением руководствовались ГОСТом Р 50723-94 «Лазерная безопасность. Общие требования безопасности при

разработке и эксплуатации лазерных изделий» и Санитарными нормами и правилами устройства и эксплуатации лазеров № 5804-91.

Минимальную ингибирующую концентрацию пероксида водорода ( $H_2O_2$ ) определяли методом двукратного разведения  $H_2O_2$  в бульоне. Серийные разведения  $H_2O_2$  готовили в жидкой среде, в которую инокулировали 100 мкл суспензии бактерий (суспензии готовили разведением 1/100 бактериальной культуры, достигающей 0,5 оптической плотности при 660 нм). Инкубацию проводили при 37°C в течение 24 часов. МИК была идентифицирована как наименьшая концентрация  $H_2O_2$ , которая все еще вызывала ингибирование роста исследуемого штамма через 24 часа.

Для формирования у культуры толерантности к перекиси водорода по методу Липовски взвесь инкубировали в течение 1 ч с субингибирующей концентрацией  $H_2O_2$  для адаптации к окислительному стрессу. Повторно определяли минимальную ингибирующую концентрацию  $H_2O_2$  после инкубации. По изменению минимальной ингибирующей концентрации судили об устойчивости культуры.

Уровень каталазной активности в клетках трех исследуемых штаммов определяли спектрофотометрически по методике Бухарина О.В. с соавт.

Для этого приготавливали взвесь с оптической плотностью 0,2 усл. ед. (на длине волны 492 нм). К 200 мкл полученной взвеси исследуемого штамма добавляли 1 мл свежеприготовленного 0,0125М раствора пероксида водорода и инкубировали 10 мин при комнатной температуре, реакцию разложения пероксида водорода каталазой останавливали добавлением 5 капель 2Н раствора соляной кислоты. Затем добавляли 1 мл свежеприготовленного 0,025М раствора иодида калия, тщательно перемешивали и осаждали клетки исследуемого штамма центрифугированием в течение 15 мин при 3000 g. Через 10 мин после центрифугирования измеряли ослабление света на длине волны 492 нм образовавшимся в надосадочной жидкости комплекса йод-йодид калия. Каталазную активность (отн. ед.) оценивали для необлученных

и облученных светодиодным фиолетовым излучением в течение 15 мин культур.

Эксперименты проводились в пятикратной повторности, данные обрабатывали с помощью пакета программ Statistica base (StatSoft, США). Достоверность отличий определяли с использованием коэффициента Стьюдента. Выборки считались достоверно отличными при  $p < 0,05$ . Применение коэффициента Стьюдента обусловлено принадлежностью наблюдаемых выборок нормальной генеральной совокупности. Проверку осуществляли методом Шапиро-Уилка по стандартным методикам.

**Структура и объем работы.** Работа, изложенная на 41 страницах, включает в себя введение, 3 главы, заключение, выводы, список использованных источников, приложение. Исследование проиллюстрировано 2 рисунками и содержит 2 таблицы. Список использованных источников включает в себя 45 наименований.

### **Основное содержание работы**

В главе «Обзор литературы» представлен анализ литературных данных о различных методах оценки резистентности бактерий к фотодинамическому воздействию светодиодного фиолетового (405 нм) излучения и фотодинамической терапии. Изложена информация о патогенных и непатогенных микроорганизмах, в том числе, *S. aureus*. Изучены и объяснены понятия толерантности, резистентности и персистенности микроорганизмов и их различия. Также в этом разделе подняты вопросы о причинах и механизмах устойчивости микроорганизмов к антимикробному излучению и активным формам кислорода, роль каталазы и ферментов.

В главе «Результаты исследования» были собраны и описаны данные по проведенному анализу. Последовательное облучение *S. aureus* светодиодным фиолетовым излучением показало снижение выживаемости с 85% до 82% с 1 по 5 цикл, с 82% до 63% с 5 по 10 цикл, восстановление численности до 65-76% с 10 по 15 цикл, и сохранение уровня выживаемости на 80% с 15 по 20 цикл.

С 20 по 25 цикл облучения для тестируемой культуры было характерно снижение числа КОЕ с 76 до 70% и выход численности на плато. Наблюдалась общая тенденция к снижению выживаемости от 80% у исходной (контрольной) культуры до 68% у тестируемой культуры к концу эксперимента.

При определении минимальной ингибирующей концентрации перекиси водорода было установлено, что с увеличением цикла облучения растет и минимальная ингибирующая концентрация. Если для исходной культуры значение минимальной ингибирующей концентрации составляло 8,8  $\mu\text{M}$ , то уже к 10 циклу облучения ее значение было равно 176  $\mu\text{M}$ , а к 20 циклу возрастало в 3 раза и составляло 264  $\mu\text{M}$ , к 25 циклу увеличивалось до 352  $\mu\text{M}$ , а 30 циклу облучения возрастало в 6 раз и достигало 528  $\mu\text{M}$ .

В результате исследования выяснили, что клетки *S. aureus* 2a, подвергнутые 10 циклам облучения синим светом, не приобрели устойчивость к  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Однако после 15-20 циклов облучения устойчивость к  $\text{H}_2\text{O}_2$  у бактерий увеличилась в 2 раза. Дальнейшее повышение толерантности к  $\text{H}_2\text{O}_2$  наблюдалось при 25 и 30 циклах облучения. Что может свидетельствовать о наличии явления толерантности к светодиодному ультрафиолетовому свету у *S. aureus* и повышении значения его минимальной ингибирующей концентрации  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Помимо значения минимальной ингибирующей концентрации исследовали значение и роль каталазы А в защите *S. aureus* от оксидативного стресса. Наблюдали, что значение показателя активности каталазы у исходного штамма после действия светодиодного фиолетового излучения достоверно не отличалось от контрольного. 10 цикл облучения характеризовался незначительным повышением данного показателя – 0,76 отн. ед. против 0,63 отн. ед. в контроле. Выраженное повышение АК в контроле отмечено после 15 цикла облучения, при этом после воздействия излучения данный показатель возрастал в 1,89 раза.

Исследование показало, что до 10 циклов облучения наблюдается снижение числа колоний *S. aureus*, что свидетельствует о чувствительности к перекиси водорода и низкой активности каталазы. После 15 циклов облучения устойчивость к окислительному стрессу увеличивается, и численность бактерий восстанавливается до значений, близких к контрольным. Таким образом, адаптация к окислительному стрессу у *S. aureus* начинается после 10 циклов облучения.

Полученные в ходе работы результаты показали, что к использованию метода фотодинамической терапии на практике необходимо подходить с осторожностью, поскольку формирование у *S. aureus* толерантности к воздействию происходит к 15 циклу облучения и может существенно ухудшить результаты лечения.

### **Выводы**

1. Для изучения феномена толерантности бактерий *S. aureus* к светодиодному фиолетовому (405 нм) излучению на основании литературных данных были использованы такие параметры как: изменение культуральных свойств и численности исследуемой культуры, определение минимальной ингибирующей концентрации перекиси водорода и толерантности к субингибирующей концентрации, оценка активности бактериальной каталазы до и после облучения.

2. Установлено, что при многократном воздействии светодиодным фиолетовым (405 нм) излучением происходит незначительное (на 0,1 см) увеличение диаметра колоний *S. aureus*, усиление золотисто-желтой пигментации, а также на 15% возрастает чувствительность культуры к излучению к 30 циклу воздействия.

3. Показано, что минимальная ингибирующая концентрации перекиси водорода для культуры *S. aureus* к 30 циклу облучения возрастает в 6 раз, при этом отмечено формирование толерантности к перекиси водорода при использовании субингибирующей концентрации.



4. Выявлено, что к 30 циклу воздействия светодиодным фиолетовым (405 нм) излучением происходит увеличение активности бактериальной каталазы А в клетках *S. aureus* в 1,7 раз без провокации облучением и в 3,2 раза на фоне облучения.

#### Список использованных источников

1. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infection: knowledge, preventive practices and colonisation among healthcare / T. Latha [et al.] // Professionals of Surgical Units. Indian Journal of Public Health Research & Development. – 2019. – V. 10, N. 12. – P. 587-91.

2. Antimicrobial photodynamic therapy against *Acinetobacter baumannii* / Da. Fonseca [et al.] // Photodiagnosis and Photodynamic Therapy. – 2021. – V. 35, N. 60. – P. 102-230.

3. Antimicrobial photodynamic therapy - a promising treatment for prosthetic joint infections / T. Briggs [et al.] // Lasers Med. Sci. – 2018. – V. 33, N. 57. – P. 523-532.

4. Blue light irradiation triggers the antimicrobial potential of ZnO nanoparticles on drug-resistant *Acinetobacter baumannii* / M. Yang [et al.] // Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. – 2018. – V. 8, N. 150. – P. 235-242.

